

Methoden zur Bestimmung des Vitamin B₆

von

Arwed Thömmes

aus

Mittweida/Sachsen

1972 # 537



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548610_0020

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

Methoden zur Bestimmung des Vitamin B₆

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Arwed Thömmes

aus

Mittweida/Sachsen



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Weinig

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.1972

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. <u>Einführung</u>	15
1.1. <u>Anlaß der Arbeit</u>	15
1.1.1. Problematik und Aufgabenstellung	15
1.2. <u>Allgemeine Voraussetzungen bei der Vitamin</u>	15
<u>B₆-Bestimmung</u>	
1.2.1. <u>Nomenklatur</u>	15
1.2.1.1. Entstehung der Begriffe Vitamin B ₆ und Pyridoxin	15
1.2.1.2. Nomenklaturregel von 1970	16
1.2.1.3. Übersicht und Abkürzungen	17
1.2.2. <u>Natürliches Vorkommen von Vitamin B₆</u>	17
1.2.2.1. Vitamin B ₆ -Aktivitäten	17
1.2.2.2. Ausscheidungsprodukte des Vitamin B ₆	20
1.2.3. <u>Eigenschaften von Vitamin B₆</u>	20
1.2.3.1. Chemische Eigenschaften	20
1.2.3.2. Physikalische Eigenschaften	20
1.2.4. <u>Probleme der Vitamin B₆-Bestimmung</u>	21
1.2.4.1. Konzentrationen	21
1.2.4.2. Labilität gegen Licht	21
1.2.4.3. Verhalten der Vitamin B ₆ -Derivate bei Nachweisen	21
1.2.5. <u>Analysengang bei der Vitamin B₆-Bestimmung</u>	21
1.2.5.1. Einteilung der Analysenprobe	21
1.2.5.2. Übersicht über den Analysengang	22
1.2.5.3. Zum Begriff "Vorbestimmungsmethode"	22
2. <u>Vorbestimmungsmethoden</u>	24
2.1. <u>Die Extraktionsverfahren</u>	24
2.1.1. <u>Allgemeines</u>	24
2.1.1.1. Bedeutung der Extraktion	24
2.1.1.2. Einteilung der Extraktionsmethoden	24

2.1.2. <u>Saure Hydrolyse</u>	24
2.1.2.1. Anwendung der sauren Extraktion	24
2.1.2.2. Probleme der sauren Extraktion	26
2.1.2.3. Bewährte Methoden	27
2.1.2.4. Methode nach WADA und Mitarbeiter	28
2.1.3. <u>Alkalische Hydrolyse</u>	28
2.1.4. <u>Enzymatische Hydrolyse</u>	28
2.2. <u>Die Auftrennungsverfahren</u>	29
2.2.1. <u>Bedeutung der Chromatographie für die Vitamin B₆-Bestimmung</u>	29
2.2.1.1. Auftrennung als Vorbestimmungsmethode	29
2.2.1.2. Auftrennung als Bestimmungsmethode	29
2.2.1.3. Einteilung der Auftrennungsmethoden	30
2.2.2. <u>Ionenaustauschchromatographie</u>	30
2.2.2.1. Wesen der Ionenaustauschchromatographie	30
2.2.2.2. Aufbau des Systems	30
2.2.2.3. Verhalten von Vitamin B ₆ an Ionenaus- tauschsäulen	32
2.2.2.4. Methoden der Ionenaustauschchromatographie	32
2.2.3. <u>Papierchromatographie</u>	32
2.2.3.1. Wesen der Papierchromatographie	32
2.2.3.2. Aufbau des Systems	35
2.2.3.2.1. Papiersorte	35
2.2.3.2.2. Laufmittel	35
2.2.3.2.3. Bedeutung des pH-Wertes	35
2.2.3.3. Bewährte Methoden der Papierchromato- graphie	37
2.2.4. <u>Dünnschichtchromatographie</u>	41
2.2.4.1. Anwendung der Dünnschichtchromatographie bei der Vitamin B ₆ -Bestimmung	41
2.2.4.2. Aufbau des Systems	41
2.2.4.2.1. Adsorptionsschicht	41
2.2.4.2.2. Lauftechnik	42
2.2.4.3. Probleme der Vitamin B ₆ -Trennung	42
2.2.4.3.1. Trennung von POL und PAM	42

	<u>Seite</u>
2.2.4.3.2. Trennung von PALP	42
2.2.4.3.3. Trennung von Oligomeren von POL	43
2.2.4.4. Bewährte Verfahren der Dünnschicht- chromatographie	43
2.2.5. <u>Elektrophorese</u>	47
2.2.5.1. Wesen der Elektrophorese	47
2.2.5.2. Arten der Elektrophorese	47
2.2.5.2.1. Papierelektrophorese	47
2.2.5.2.2. Säulenelektrophorese	49
2.2.5.2.3. Dünnschichtelektrophorese	50
2.2.6. <u>Gaschromatographie</u>	50
2.2.6.1. Bedeutung der Gaschromatographie für die Vitamin B ₆ -Bestimmung	50
2.2.6.2. Aufbau der Gaschromatographie-Apparatur	50
2.2.6.3. Vorbereitung des Vitamin B ₆ zur gas- chromatographischen Trennung	53
2.2.6.4. Auswertung des Chromatogramms	57
2.2.6.4.1. Qualitative Auswertung	57
2.2.6.4.2. Quantitative Auswertung	57
2.2.6.5. Zusammenfassung	57
3. <u>Bestimmungsmethoden</u>	58
3.1. <u>Einführung</u>	58
3.1.1. Aufgabe der Vitamin B ₆ -Bestimmungsmethoden	58
3.1.2. Definition	58
3.1.3. Abgrenzung gegenüber den Vorbestimmungs- methoden	58
3.1.4. Einteilung der Bestimmungsmethoden	59
3.1.5. Problematik zur Trennung von physikalischen und chemischen Methoden	59
3.1.6. Gesichtspunkte für die Wahl der Bestimmungs- methode	60
3.1.7. Empfindlichkeit des Nachweises	60
3.2. <u>Die physikalischen Bestimmungsmethoden</u>	60
3.2.1. <u>Allgemeines</u>	60
3.2.1.1. Definition	60
3.2.1.2. Abgrenzung gegen chemische Bestimmungs- methoden	61

3.2.1.3. Einteilung	61
3.2.2. Direkte spektrophotometrische Bestimmung	61
3.2.2.1. Absorptionsspektrum des Vitamin B ₆ im UV-Licht	61
3.2.2.1.1. Qualitativer Nachweis	61
3.2.2.1.2. Quantitativer Nachweis	62
3.2.2.2. Probleme der Photometrie	62
3.2.2.2.1. Photosensibilität von Vitamin B ₆	62
3.2.2.2.2. Unterschiedliche Absorptionsmaxima von POL, PAL und PAMP	64
3.2.2.2.3. Störfaktoren der spektrophotometrischen Methode	64
3.2.2.3. Bewährte spektrophotometrische Methoden	64
3.2.3. <u>Direkte fluorometrische Bestimmung</u>	65
3.2.3.1. Fluoreszenz als Vitamin B ₆ -Bestimmungsmethode	65
3.2.3.1.1. Definition	65
3.2.3.1.2. Entwicklung neuer fluorometrischer Verfahren	65
3.2.3.1.3. Abgrenzung gegenüber der indirekten Fluoreszenzmessung	65
3.2.3.2. Fluorometrisches Verhalten des Vitamin B ₆	68
3.2.3.2.1. Qualitative Spezifität	68
3.2.3.2.2. Quantitative Spezifität	68
3.2.3.3. Störfaktoren der Fluoreszenzmessung	68
3.2.3.4. Gesicherte fluorometrische Nachweisverfahren	71
3.2.3.4.1. Methode nach FASELLA und Mitarbeiter	71
3.2.3.4.2. Methode nach COURSIN und Mitarbeiter	71
3.2.3.5. <u>Phosphorimetrische Eigenschaften des Vitamin B₆</u>	72
3.2.3.5.1. Versuchsanordnung	73
3.2.3.5.2. Wirkungsgrad	73
3.2.3.6. Zusammenfassung	73
3.2.4. <u>Polarographische Bestimmungsmethode</u>	73
3.2.4.1. Aufbau des Polarographen	74

	<u>Seite</u>
3.2.4.2. Arbeitsprinzip und Auswertung der Meßergebnisse	74
3.2.4.3. Methoden der Polarographie	75
3.2.4.3.1. Methode nach LINGANE	75
3.2.4.3.2. Methode nach MANOUSEK und KOCOVA	76
3.2.4.3.3. Methode nach MANOUSEK und ZUMAN	76
3.2.5. <u>Kernresonanzspektroskopische Bestimmungsmethode</u>	77
3.2.5.1. Allgemeines	77
3.2.5.2. Aufgabenbereich der Kernresonanzspektroskopie	77
3.2.5.2.1. Arbeitsprinzip	78
3.2.5.2.2. Lösungsmittel	78
3.2.5.3. Kernresonanzspektren von Vitamin B ₆ -Derivaten	78
3.2.5.3.1. Lage der Spektren	79
3.2.6. <u>Massenspektroskopische Bestimmungsmethode</u>	79
3.2.6.1. Arbeitsprinzip des Massenspektrometers	79
3.2.6.2. Verhalten des Vitamin B ₆ bei der Massenspektroskopie	79
3.2.6.2.1. Quantitative und qualitative Analyse	81
3.2.6.3. Zusammenfassung	81
3.2.7. <u>Infrarotspektroskopische Bestimmungsmethode</u>	82
3.2.7.1. Entwicklung der Infrarotspektroskopie als Analyseverfahren	82
3.2.7.2. Aufbau der Infrarotspektroskopie des Vitamin B ₆	82
3.2.7.2.1. Probleme der Analysenprobe	82
3.2.7.2.2. Qualitative Analyse	82
3.2.7.2.3. Quantitative Analyse	83
3.2.7.3. Infrarotspektroskopie von Vitamin B ₆	83
3.2.7.4. Zusammenfassung	84
3.2.8. <u>Isotopenmethode</u>	84
3.2.8.1. Entwicklung der Isotopenmethode als Analyseverfahren	84
3.2.8.2. Aufbau der Isotopenmessung	84

3.3. <u>Die chemischen Bestimmungsmethoden</u>	85
3.3.1. <u>Allgemeines</u>	85
3.3.1.1. Entwicklung der chemischen Methode	85
3.3.1.2. Abgrenzung gegenüber physikalischen Bestimmungsmethoden	85
3.3.1.3. Reaktionen der chemischen Bestimmungsmethoden	86
3.3.1.4. Labortechnische Einteilung	87
3.3.2. <u>Maßanalytische Bestimmungen</u>	87
3.3.2.1. Titration mit Perchlorsäure	89
3.3.2.2. Titration mit Thiosulfat	89
3.3.2.3. Zusammenfassung	89
3.3.3. <u>Absorptionsphotometrische Bestimmungen</u>	90
3.3.3.1. <u>Reaktion an der phenolischen OH-Gruppe</u>	90
3.3.3.1.1. Bestimmung mit FeCl_3	90
3.3.3.1.2. Bestimmung mit Folin-Denis-Reagenz	91
3.3.3.2. <u>Reaktion an der phenolischen OH-Gruppe mit unsubstituierter Parastellung</u>	92
3.3.3.2.1. Bestimmung mit p-Nitroanilin	92
3.3.3.2.2. Bestimmung mit p-Anisidin	92
3.3.3.2.3. Bestimmung mit Sulfanilsäure	92
3.3.3.2.4. Bestimmung mit p-Aminoacetophenon	93
3.3.3.2.5. Bestimmung mit 2,6 Dichlorchinonchlorimid	93
3.3.3.2.5.1. Methode nach SCUDI	94
3.3.3.2.5.2. Methode nach HOCHBERG und Mitarbeiter	94
3.3.3.2.5.3. Methode nach SCEMAMA	95
3.3.3.2.5.4. Autographie mit Gibbs-Reagenz	95
3.3.3.2.6. Bestimmung mit 2,6-Dibromchinonchlorimid	96
3.3.3.2.7. Bestimmung mit 4-Amino-6-chloro-Benzin-disulfonamid	96
3.3.3.2.8. Bestimmung mit Diäthyl-para-phenylen-diamin	97
3.3.3.3. <u>Reaktion an der α-Methylgruppe</u>	98
3.3.3.4. <u>Reaktion unter Öffnung des Pyridinringes</u>	99
3.3.3.5. <u>Reaktion unter Bildung von Phthaleinen</u>	100
3.3.3.6. <u>Reaktion an der 4-Formylgruppe</u>	100

	<u>Seite</u>
3.3.3.6.1. Bestimmung mit Äthanolamin	100
3.3.3.6.2. Bestimmung mit Thiophen	101
3.3.3.6.3. Bestimmung mit Phenylhydrazin	102
3.3.3.6.4. Bestimmung mit Aceton	104
3.3.3.6.5. Bestimmung mit MBTH	104
3.3.4. <u>Emissionsphotometrische Bestimmungen</u>	106
3.3.4.1. <u>Allgemeines</u>	106
3.3.4.1.1. Abgrenzung der direkten und indirekten Fluorometrie	106
3.3.4.1.2. Methoden der emissionsphotometrischen Bestimmung	106
3.3.4.1.2.1. Lactonmethode	107
3.3.4.1.2.2. "Cyanohydrinmethode"	107
3.3.4.1.2.2.1. Zur Frage des gebildeten Reaktions- produktes	107
3.3.4.1.2.2.2. Beweis nach OHISHI und FUKUI	108
3.3.4.1.2.2.3. Beweis nach TAKANASHI und Mitarbeiter	108
3.3.4.1.2.2.4. Umbenennung der "Cyanohydrinmethode" in "CYANIDMETHODE"	108
3.3.4.2. <u>Fluoreszenzmessung mit Hilfe der Lacton- methode</u>	110
3.3.4.2.1. <u>Bestimmung von 4-Pyridoxsäure</u>	110
3.3.4.2.1.1. Methode nach HUFF und PERLZWEIG	110
3.3.4.2.1.2. Methode nach SARETT	111
3.3.4.2.1.3. Methode nach FUJITA und Mitarbeiter	111
3.3.4.2.1.4. Methode nach REDDY und Mitarbeiter	111
3.3.4.2.1.5. Mikromethode nach WOODRING und Mit- arbeiter	112
3.3.4.2.2. <u>Bestimmung von Pyridoxol</u>	112
3.3.4.2.2.1. Methode nach FUJITA und Mitarbeiter	112
3.3.4.2.2.2. Methode nach HENNESSY und Mitarbeiter	113
3.3.4.2.2.3. Mikromethode nach STORVICK und Mit- arbeiter	113
3.3.4.2.3. <u>Bestimmung von Pyridoxal</u>	113
3.3.4.2.3.1. Methode nach FUJITA und Mitarbeiter	113

3.3.4.2.3.2. Methode nach STORVICK und Mitarbeiter	113
3.3.4.2.4. <u>Bestimmung von Pyridoxamin</u>	114
3.3.4.2.4.1. Methode nach FUJITA und Mitarbeiter	114
3.3.4.2.4.2. Mikromethode nach STORVICK und Mitarbeiter	114
3.3.4.3. <u>Fluoreszenzmessung mit Hilfe der Cyanidmethode</u>	115
3.3.4.3.1. <u>Eigenschaften der Cyanidmethode</u>	115
3.3.4.3.1.1. Reaktionsablauf	115
3.3.4.3.1.2. Spezifität der Reaktion	115
3.3.4.3.1.3. Nachweisgrenze	116
3.3.4.3.2. <u>Bestimmung von Pyridoxal und Pyridoxal-phosphat</u>	116
3.3.4.3.2.1. Methode nach BONAVIDA	116
3.3.4.3.2.2. Methode nach YAMADA und Mitarbeiter	118
3.3.4.3.3. <u>Bestimmung von Vitamin B₆-Derivaten nach ihrer Umwandlung in Pyridoxal</u>	118
3.3.4.3.3.1. Bestimmung von PALP	119
3.3.4.3.3.2. Bestimmung von PAM	119
3.3.4.3.3.3. Bestimmung von POL	121
3.4. <u>Die enzymatischen Bestimmungsmethoden</u>	121
3.4.1. <u>Allgemeines</u>	121
3.4.1.1. Direkte und indirekte Bestimmungsmethoden	121
3.4.1.1.1. Indirekte Bestimmung	122
3.4.1.1.2. Direkte Bestimmung	122
3.4.1.2. Abgrenzung gegen chemische und mikrobiologische Bestimmungsmethoden	122
3.4.1.3. Vor- und Nachteile der enzymatischen Bestimmung	123
3.4.1.4. Aufbau der enzymatischen Bestimmung	123
3.4.1.4.1. Darstellung des Apoenzyms	123
3.4.1.4.2. Vorbereitung der Analysenprobe	124
3.4.1.4.3. Durchführung der Bestimmung	124
3.4.1.4.4. Messung des Versuchsergebnisses	125
3.4.1.5. Einteilung der enzymatischen Bestimmungsmethoden	125

3.4.2. <u>Tyrosindecaboxylasemethode</u>	125
3.4.2.1. <u>Versuchsaufbau</u>	125
3.4.2.1.1. Reaktion	125
3.4.2.1.2. Manometrische Auswertung	126
3.4.2.1.3. Isotopenmethode	126
3.4.2.2. <u>Manometrische Bestimmung</u>	126
3.4.2.2.1. Methode nach UMBREIT und Mitarbeiter	126
3.4.2.2.2. Modifikationen	127
3.4.2.2.2.1. Methode nach BOXER und Mitarbeiter	127
3.4.2.2.2.2. Methode nach LABOUESSE und Mitarbeiter	127
3.4.2.3. <u>Isotopenmethode</u>	128
3.4.2.3.1. Vorteile der Isotopenmethode	128
3.4.2.3.2. Methode nach HAMFELT	128
3.4.2.3.3. Methode nach MARUYAMA und COURSIN	129
3.4.2.3.4. Methode nach CHABNER und LIVINGSTON	129
3.4.2.3.5. Methode nach SUNDARESAN und COURSIN	130
3.4.3. <u>Tryptophanasemethode</u>	130
3.4.3.1. <u>Versuchsablauf</u>	130
3.4.3.1.1. Reaktion	130
3.4.3.1.2. Auswertung der Ergebnisse	131
3.4.3.2. <u>Colorimetrische Bestimmung</u>	131
3.4.3.2.1. Methode nach WADA und Mitarbeiter	131
3.4.3.2.2. Methode nach McCORMICK und Mitarbeiter	132
3.4.3.2.3. Methode nach DONALD und FERGUSON	132
3.4.3.2.4. Methode nach GAILANI	132
3.4.3.2.5. Methode nach STORVICK und Mitarbeiter	133
3.4.3.3. <u>Isotopenmethode</u>	133
Methode nach OKUDA und Mitarbeiter	
3.4.4. <u>Transaminasemethode</u>	134
3.4.4.1. <u>Versuchsablauf</u>	134
3.4.4.1.1. Reaktion	135
3.4.4.1.2. Messung	135
3.4.4.2. <u>Methode nach SCHREIBER</u>	135
3.4.4.2.1. Darstellung des Apoenzyms	135
3.4.4.2.2. Darstellung der Analysenprobe	136
3.4.4.2.3. Differentialbestimmungsmethode für PALP und PAMP	136

3.4.4.2.4. Die Durchführung der Bestimmung	137
3.4.4.2.5. Messung	137
3.4.4.3. <u>Methode nach WALSH</u>	137
3.4.5. <u>Apophosphorylasemethode</u>	138
Methode nach HINES und Mitarbeiter	
 3.5. <u>Die mikrobiologischen Bestimmungsmethoden</u>	 139
3.5.1. <u>Allgemeines</u>	139
3.5.1.1. Versuchsprinzip	139
3.5.1.1.1. Wachstumsmessung	139
3.5.1.1.2. Vor- und Nachteile	139
3.5.1.2. Vorbestimmungsmethoden	140
3.5.1.2.1. Der hydrolytische Aufschluß	140
3.5.1.2.1.1. Antagonistische Einflüsse	141
3.5.1.2.1.2. Synergistische Einflüsse	141
3.5.1.2.2. Die chromatographische Auftrennung	141
3.5.1.2.2.1. "Einzelbestimmungsmethode" nach TOEPFER und LEHMANN	141
3.5.1.2.2.2. Differentialbestimmungsmethode	141
3.5.1.3. Versuchsablauf der Vitamin B ₆ -Bestimmung	142
3.5.1.3.1. Wahl des Teststammes	142
3.5.1.3.2. Vorbereitung der Testsubstanz	144
3.5.1.3.3. Durchführung der Bestimmung	145
3.5.1.3.4. Messung und Auswertung der Ergebnisse	145
3.5.1.3.4.1. Gravimetrische und turbidimetrische Messung	145
3.5.1.3.4.2. Geometrische Messung	145
3.5.2. <u>Bestimmung mit Bakterien</u>	148
3.5.2.1. <u>Test mit Streptococcus faecalis</u>	148
3.5.2.1.1. Verwendung	148
3.5.2.1.2. Meßbereich	148
3.5.2.1.3. Durchführung des Tests	148
3.5.2.1.4. Nachteil des Streptococcus faecalis- Test	149

3.5.2.2. <u>Test mit Streptococcus faecium</u>	149
3.5.2.2.1. Empfindlichkeit gegen DL-Alanin	149
3.5.2.2.2. Empfindlichkeit gegen Alanin-Peptide	149
3.5.2.2.3. Durchführung des Tests	150
3.5.2.3. <u>Test mit Lactobazillus casei</u>	150
3.5.2.3.1. Spezifität und Meßbereich	151
3.5.2.3.2. Störfaktoren	151
3.5.2.3.3. Durchführung des Tests	151
3.5.2.4. <u>Test mit Escherichia coli</u>	152
3.5.2.4.1. Vorteile des Colitests	152
3.5.2.4.2. Durchführung des Tests	152
3.5.3. <u>Bestimmung mit Hefen</u>	152
3.5.3.1. <u>Test mit Saccharomyces carlsbergiensis</u>	152
3.5.3.1.1. Anwendungsbereich	152
3.5.3.1.1.1. Spezifität des Hefestammes	153
3.5.3.1.1.2. Meßbereich	153
3.5.3.1.1.3. Störfaktoren	153
3.5.3.1.1.4. Anwendungsbeispiele	154
3.5.3.1.2. Durchführung des Tests	154
3.5.3.2. <u>Test mit Saccharomyces oviformis und</u> <u>Saccharomyces cerevesiae</u>	154
3.5.3.2.1. Spezifität und Meßbereich	154
3.5.3.2.2. Anwendungsbereich	155
3.5.3.3. <u>Test mit Klöckera brevis</u>	155
3.5.3.3.1. Anwendungsbereich	155
3.5.3.3.2. Durchführung des Tests	155
3.5.4. <u>Bestimmung mit Schimmelpilzen</u>	156
3.5.4.1. <u>Test mit Neurospora sitophila</u>	156
3.5.4.1.1. Anwendungsbereich	156
3.5.4.1.2. Spezifität	156
3.5.4.1.3. Durchführung des Tests	157
3.5.5. <u>Bestimmung mit Ciliaten</u>	157
3.5.5.1. <u>Test mit Tetrahymena pyriformis</u>	157
3.5.5.1.1. Eigenschaften des Teststammes	157
3.5.5.1.2. Durchführung des Tests	158

	<u>Seite</u>
3.5.5.1.3. Meßergebnisse	158
3.6. <u>Die biologischen Bestimmungsmethoden</u>	159
3.6.1. <u>Allgemeines</u>	159
3.6.1.1. Bedeutung des biologischen Tests	159
3.6.1.2. Definition und Abgrenzung	160
3.6.1.3. Mangelsymptome	160
3.6.1.4. Vorbestimmungsmethoden	161
3.6.1.5. Einteilung	161
3.6.2. <u>Akrodynietest</u>	161
3.6.2.1. Methode nach HALLIDAY und EVANS	162
3.6.2.2. Methode nach SCHNEIDER und Mitarbeiter	162
3.6.2.3. Nachteile des Tests	162
3.6.3. <u>Wachstumstest</u>	162
3.6.3.1. Rattenwachstumstest	162
3.6.3.2. Kükenwachstumstest	164
3.6.3.2.1. Methode nach OTT	164
3.6.3.2.2. Methode nach SARMA und Mitarbeiter	164
3.6.3.3. Triboliumwachstumstest	164
3.6.4. <u>Xanthurensäureausscheidungstest</u>	165
Methode nach KÖRNER und Mitarbeiter	
3.6.5. Zusammenfassung	166
4. Zusammenfassung und Diskussion	168
5. Literaturverzeichnis	172

1. Einführung

1.1. Anlaß der Arbeit

Im allgemeinen spielen Vitamine in der forensischen Toxikologie nur eine geringe Rolle, obwohl immer wieder toxische Wirkungen bei Überdosierungen beschrieben worden sind.

Da Vitamine aber häufig in Mischpräparaten enthalten sind, können sie gelegentlich als Leitsubstanzen für pharmakologische Untersuchungen dienen. Zu diesem Zweck müssen die Verteilung der Vitamine im menschlichen Körper und ihr Stoffwechsel untersucht werden. Um die erhaltenen Werte richtig beurteilen zu können, muß in gleicher Weise geklärt werden, nach welcher Methode diese Werte bestimmt worden sind; darüber hinaus soll die Zuverlässigkeit der Analyseverfahren möglichst genau bekannt sein.

1.1.1. Um diesen Problemkreis speziell für das Vitamin B₆ befriedigend zu klären, können selbst große Vitaminhandbücher (GYÖRGY 1951 a, KÜHNAU, STEPP und SCHROEDER 1952/57, SEBRELL und HARRIS 1954, KNOBLOCH und VOGEL 1957 und FRAGNER 1964/65) nur bedingt herangezogen werden. Dies ist verständlich, denn angesichts der ungeheuren Stofffülle vermitteln sie bestenfalls eine allgemeine Übersicht, oder Einblick auf Teilgebiete der Vitaminforschung. Hinzu kommt der Umstand, daß ein Teil dieser Handbücher in ihrem Erscheinungsjahr zurückliegen und durch neuere Ergebnisse ergänzt werden können. Andererseits wird in aller Welt auf den Gebieten der Vitamin B₆-Forschung mit viel Interesse gearbeitet, so daß neue Erkenntnisse vorliegen, welche verarbeitet, geordnet und mit vorhandenem Material verglichen werden müssen.

In der folgenden Arbeit soll eine Übersicht über die Bestimmungsmethoden des Vitamin B₆ gegeben werden.

1.2. Allgemeine Voraussetzungen bei der Vitamin B₆-Bestimmung

1.2.1. Nomenklatur

1.2.1.1. GYÖRGY nannte den von ihm 1934 entdeckten Wirkstoff Vitamin B₆, weil es der 6. Teil des damals bekannten Vitamin B-Komplexes war. Da dieses Vitamin als Schutzfaktor einer

speziellen Rattendermatitis angesehen wurde, erhielt es auch in der Folgezeit die Bezeichnungen Adermin, Anti-Dermatitis-Faktor, Anti-Akrodyniefaktor und Rattenpellagra-Schutzstoff. Nachdem 1939 die Isolierung und die Synthese des Vitamin B₆ gelungen waren, wichen diese bisher verwendeten Bezeichnungen dem 1940 vom "Council of Pharmacy and Chemistry" festgelegten Begriff "Pyridoxin" weil ein Pyridinabkömmling vorlag, der einige Sauerstoffatome enthielt.

Als "Pseudopyridoxin" bezeichnete man eine zeitlang einige Substanzen mit Vitamin B₆-Aktivität, die sich vom soeben synthetisierten "Pyridoxin" chemisch unterschieden. Im Gegensatz zum Pyridoxin enthielten sie jeweils eine Aldehyd- und eine Aminogruppe. Sie erhielten in der Folgezeit deshalb die Bezeichnungen Pyridoxal und Pyridoxamin. Nach der Entdeckung des Pyridoxal und des Pyridoxamin und ihren Phosphorylierungsprodukten, dem Pyridoxalphosphat und dem Pyridoxaminphosphat als Vitamin B₆-aktiver Substanzen, hat sich in der angelsächsischen Literatur die Bezeichnung "Pyridoxine" als Sammelbegriff für Wirkstoffe mit Vitamin B₆-Aktivität durchgesetzt. 1960 wurde von der "Commission on the Nomenclature of Biological Chemistry of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)" eine vorläufige Nomenklaturregel für das Vitamin B₆ aufgestellt. Sie besagt, daß die Bezeichnung "Pyridoxin" als Gruppenname für die natürlich vorkommenden Pyridinderivate mit Vitamin B₆-Aktivität stehen soll (STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING 1964). In der Europäischen Literatur hat sich dagegen die Bezeichnung "Vitamin B₆" als Sammelbegriff für die oben genannten Pyridinderivate weitgehend erhalten.

1.2.1.2. An Versuchen, den Namen Vitamin B₆ und Pyridoxin als Begriffe für Vitamin B₆-Aktivitäten aus der Literatur zu verbannen, hat es nicht gefehlt. Unter anderem machten RENNAGEL und KORYTNYK (1968) den Vorschlag, das Wort "Vitamin B₆" durch das Synonym "Pyridox" zu ersetzen. Dieser Name sollte sowohl für die Substanz als auch für den Vitaminbegriff Verwendung finden.

In dem Bestreben die Nomenklatur des Vitamin B₆ zu systematisieren, beschloß die "Commission on Nomenclature of Biological Chemistry of the International Union of Pure and Applied Chemistry" 1970 erneut folgende Änderungen und Erweiterungen zu ihren Nomenklaturvorschlägen von 1960:

- Der Ausdruck "Vitamin B₆" soll als allgemeine Bezeichnung für alle 2-Methylpyridin-Derivate verwendet werden, welche qualitativ die biologische Aktivität des "Pyridoxins" aufweisen. (Anonymus 1970 b)
- "Pyridoxin" darf nicht mehr als allgemeiner Begriff für "Vitamin B₆" gebraucht werden, sondern steht wie "Pyridoxol" als Kurzbezeichnung für die Verbindung 3-Hydroxy-4,5-bis (hydroxymethyl)-2-methylpyridin.
- Die oxydierten Metaboliten des "Pyridoxal" erhalten die Bezeichnungen "4-Pyridoxsäure und 4-Pyridoxolacton".

1.2.1.3. Aus Raumgründen werden in Tabellen Kurzzeichen für die einzelnen Vitamin B₆-Derivate erforderlich. Für diese Abkürzungen bestehen in der Literatur bisher keine Regeln, sie unterscheiden sich von Autor zu Autor. In der vorliegenden Arbeit finden die Abkürzungen nach CONTRACTOR und SHANE (1968), SCHREIBER, ECKSTEIN, OESER und HOLZER (1964 a und b) und YAMADA, SAITO und TAMURA (1966 a und b) Verwendung.

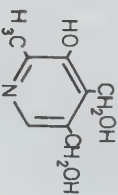
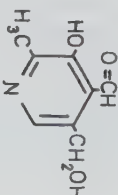
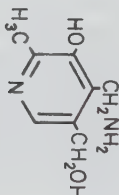
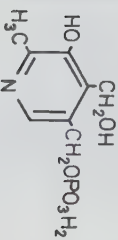
4-Pyridoxsäure wird in der Arbeit mit PXS abgekürzt;
4-Pyridoxolacton wird dagegen nicht abgekürzt.

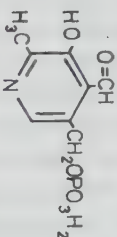
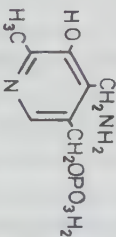
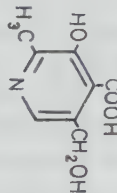
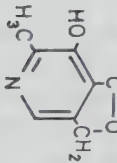
Die Tabelle 1 enthält für die Derivate der Vitamin B₆-Gruppe die Strukturformeln, die chemischen Bezeichnungen und die nach der IUPAC-Regel 1970 festgelegten Namen und ihre Abkürzungen.

1.2.2. Natürliches Vorkommen von Vitamin B₆

1.2.2.1. In der Natur kommen Pyridinderivate mit Vitamin B₆-Aktivität in den 6 Formen, als POL, PAL, PAM, POLP, PALP und PAMP vor. Die frei vorkommenden Wirkstoffe, POL, PAL und PAM unterscheiden sich durch ihre funktionellen Gruppen in 4-Stellung. Von ihnen leiten sich die Phosphorylierungsprodukte

Tabelle 1: Kurzbezeichnungen, chemische Bezeichnungen, Strukturformeln und Abkürzungen der Vitamin B₆-Derivate

Kurzbezeichnung	chemische Bezeichnung	Strukturformel	Abkürzung
Pyridoxol oder Pyridoxin	2-Methyl-3-hydroxy- 4,5-hydroxymethyl- pyridin		POL
Pyridoxal	2-Methyl-3-hydroxy- 4-formyl-5-hydroxy- methylpyridin		PAL
Pyridoxamin	2-Methyl-3-hydroxy- 4-aminomethyl-5- hydroxymethylpyridin		PAM
Pyridoxol- phosphat oder Pyridoxin- phosphat	2-Methyl-3-hydroxy- 4-hydroxymethyl-5- pyridylmethylphosphor- säure		POLP

Kurzbezeichnung	chemische Bezeichnung	Strukturformel	Abkürzung
Pyridoxal-phosphat	2-Methyl-3-hydroxy-4-formyl-5-pyridyl-methylphosphorsäure		PALP
Pyridoxamin-phosphat	2-Methyl-3-hydroxy-4-aminomethyl-5-pyridyl-methylphosphorsäure		PAMP
Pyridoxsäure	2-Methyl-3-hydroxy-4-carboxy-5-pyridinmethylpyridin		PXS
Pyridoxolacton	Lacton von 2-Methyl-3-hydroxy-4-carboxy-5-hydroxymethylpyridin		---

POLP, PALP und PAMP ab. Sie kommen an Protein gebunden in der Biosphäre vor.

1.2.2.2. Pyridoxsäure besitzt als Ausscheidungsprodukt des Vitamin B₆ im Urin keine Enzymaktivität mehr, wird aber auf Grund ihrer klinischen Bedeutung bei den Vitamin B₆-Nachweismethoden mit besprochen. Glukuronsäure- und Schwefelsäurepaarlinge des Pyridoxol werden von FORST (1966) für den Hund wie auch für den Menschen als Ausscheidungsprodukte im Urin angeführt. Obwohl sie wie Pyridoxsäure als Ausscheidungsprodukte gleiche Bedeutung hätten, bleiben sie in der gesamten Literatur des Vitamin B₆-Nachweises unberücksichtigt. BURG (1970) untersuchte ausscheidungspflichtige Stoffe des Vitamin B₆-Katabolismus bei Pseudomonas sp. IA und Pseudomonas sp. MA. Diese Ausscheidungsprodukte kommen für höhere Organismen nicht in Frage. Spezielle Nachweismethoden für diese Abbauprodukte bespricht der Verfasser.

1.2.3. Eigenschaften von Vitamin B₆

1.2.3.1. Die Vitamin B₆-Derivate haben eine Reihe chemischer und physikalischer Eigenschaften gemeinsam. Diese müssen bei der Bestimmung beachtet werden, auf sie stützt sich der Analysengang. Die Pyridoxin-Base ist gut löslich in Wasser, Aceton und Alkohol und weniger löslich in Äther und Chloroform. 1 g Pyridoxinhydrochlorid löst sich in 4,5 ml Wasser oder 90 ml Äthanol. Eine wässrige Lösung von Pyridoxinhydrochlorid hat einen pH-Wert von etwa 3,2. Im alkalischen und neutralen Medium ist Pyridoxin lichtempfindlich. Vitamin B₆ wird schnell durch oxydierende Stoffe zerstört. Die freie Form des Vitamins ist gegen Hitze, Säure und Basen relativ stabil; PALP, POLP und PAMP werden jedoch durch Säure, Alkali und Hitze hydrolysiert (KNOBLOCH 1963).

1.2.3.2. Als physikalische Konstanten sind das UV-Spektrum, das IR-Spektrum, das Kernresonanz-Spektrum und das Massenspektrum für Vitamin B₆ charakteristisch. Diese finden in verschiedenen Nachweismethoden ihre praktische Anwendung.

1.2.4. Probleme der Vitamin B₆-Bestimmung

1.2.4.1. Eine Reihe von Schwierigkeiten müssen bei der Entwicklung empfindlicher und spezifischer Nachweismethoden berücksichtigt werden. Die Vitamin B₆-Gruppe ist in der Natur zwar weit verbreitet, kommt aber auf Grund ihrer enzymatischen Funktionen nur in katalytischen Konzentrationen vor.

1.2.4.2. Im neutralen und alkalischen Medium sind die Vitamin B₆-Derivate sehr lichtempfindlich, so daß diese Eigenschaft bei allen Nachweismethoden in Rechnung gestellt werden muß.

1.2.4.3. Bei den Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden müssen die einzelnen Derivate einschließlich der Pyridoxsäure gemeinsam, aber auch einzeln bestimmt werden können. Obgleich sie als essentielle Wachsfaktoren molar gesehen etwa gleiche biologische Wirkung auf den Organismus haben (SNELL und RANNEFELD 1945) bedingt ihr Unterschied in den funktionellen Gruppen in 4- und 5-Stellung ein unterschiedliches Verhalten bei chemischen, physikalischen, enzymatischen und teilweise auch mikrobiologischen Nachweisverfahren.

1.2.5. Analysengang bei der Vitamin B₆-Bestimmung

1.2.5.1. Ein zusätzliches Problem der Vitamin B₆-Bestimmung ist der Analysengang in Abhängigkeit des zu untersuchenden Materials. In Anlehnung an GSTIRNER (1965), TOEPFFER und MacARTHUR POLANSKY (1964) und STORVICK und McLEOD PETERS (1964) lassen sich die Analysenproben in die vier folgenden Kategorien einteilen:

- Pharmazeutische Präparate (Reinstpräparate)
- Pharmazeutische Präparate (Multivitaminpräparate)
- Nahrungs- und Futtermittel
- Biologisches Gewebe

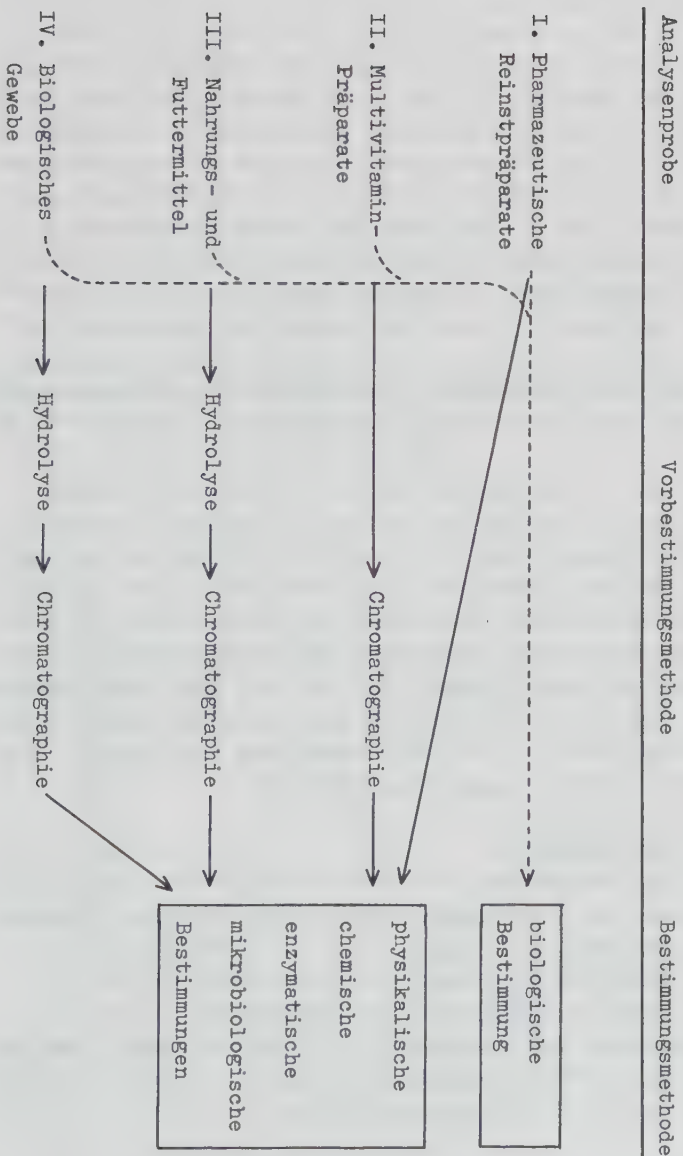
Während dem Laboranten grundsätzlich die Wahl der Bestimmungsmethode offen steht, ist er je nach der Art der Analysenprobe an ein Mindestmaß vorbereitender Schritte gebunden. Diese sind die Hydrolyse und die Auftrennung des Hydrolysates.

1.2.5.2. In Abhängigkeit von der Zielsetzung des Nachweises, dem zu untersuchenden Material und der gewählten Nachweismethode unterscheiden sich deshalb die Analysengänge. So läßt sich Vitamin B₆ in Reinstpräparaten sofort spektrophotometrisch bestimmen, weil keine Stoffe mit irrelevanter Absorption vorliegen. Multivitaminpräparate müssen vor der eigentlichen Vitamin B₆-Bestimmung chromatographisch aufgetrennt werden, weil andere Vitamine den Nachweis stören können. Nahrungsmittel und biologisches Material werden hydrolytisch aufgeschlossen und die einzelnen Vitaminkomponenten chromatographisch abgetrennt. Erst dann kann die eigentliche Bestimmung durchgeführt werden. Eine schematische Übersicht über den Analysengang als Funktion der Analysenprobe vermittelt Tabelle 2.

1.2.5.3. Man erkennt, daß einerseits durch die sogenannten biologischen Nachweisverfahren alle Vitamin B₆-aktiven Substanzen erfaßt werden, gleich ob sie in Reinstpräparaten oder in biologischem Material vorliegen; sie brauchen vorher weder hydrolysiert noch chromatographiert werden. Andererseits kann bereits die unspezifische chromatographische Auftrennung schon eine Bestimmungsmöglichkeit sein, wenn von vornherein bekannt ist, welche Substanzen in der Probe enthalten sind. Diese Verbindung der unspezifischen Methode der Hydrolyse und der chromatographischen Aufbereitung des Hydrolysates mit der eigentlichen Methode der Vitamin B₆-Bestimmung führen zu der Vorstellung, daß die Methode der "Vorbestimmung" auch ein fester Bestandteil in der Systematik der eigentlichen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden sein muß.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb der Versuch unternommen werden, die Hydrolyse und die Auftrennung des Hydrolysates als eigenen Themenkreis zu behandeln, und sie als sogenannte "Vorbestimmungsmethoden" in die Systematik der Vitamin B₆-Bestimmung zu integrieren.

Tabelle 2: Schema des Analysenganges bei der Vitamin B₆-Bestimmung



2. Vorbestimmungsmethoden

2.1. Die Extraktionsverfahren

2.1.1. Allgemeines

2.1.1.1. Die Erkenntnis, daß die verschiedenen Wirkstoffe der Vitamin B₆-Gruppe unterschiedlich fest an das biologische Material gebunden sein können, warf das Problem der Extraktion auf. SIEGEL, MELNIK und OSER (1943) zeigten, daß das Pyridoxin durch Säurehydrolyse freigesetzt werden muß, bevor überhaupt eine genaue Vitamin B₆-Bestimmung durchgeführt werden konnte. Für STORVICK und McLEOD PETERS (1964) ist "die Freisetzung des Vitamin B₆ aus seinem vielfach gebundenen Zustand im biologischen Material, das Problem einer brauchbaren Bestimmungsmethode schlechthin". Sie führten weiter aus, daß die von biologischem Material erhaltenen Werte, als Ergebnisse der Extraktionsmethode gewertet werden müssen, "ungeachtet der relativen Spezifität und Empfindlichkeit der verwendeten quantitativen Methode der Vitaminbestimmung".

2.1.1.2. Da im biologischen Gewebe der Vitamin B₆-Komplex frei, phosphoryliert und als Apoenzym proteingebunden nebeneinander vorkommen kann, stellt sich die Frage nach der geeigneten Extraktionsmethode. Wir unterscheiden die basische, saure und enzymatische Hydrolyse. Die Entscheidung zur Wahl der einen oder anderen Hydrolysetechnik ist abhängig von der Frage, ob das gesamte Vitamin B₆, oder nur das enzymgebundene PALP bestimmt werden sollen. Zur Bestimmung des Gesamtvitamin B₆ wird das Gewebe in der Regel sauer oder enzymatisch, zur Bestimmung von PALP alkalisch hydrolysiert.

2.1.2. Saure Hydrolyse

2.1.2.1. Die Säurehydrolyse wird von den Autoren unter den Gesichtspunkten der folgenden drei variablen Größen durchgeführt:

- pH-Wert der Lösung

- Menge der Säure pro vermuteter Menge Vitamin B₆

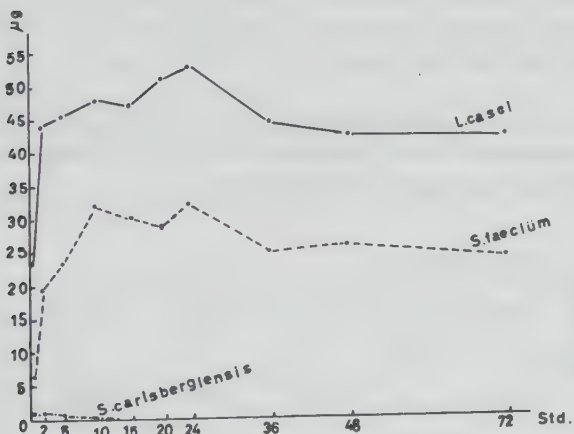
- Druck und Dauer des Autoklavierens

RUBIN, SCHEINER und HIRSCHBERG (1947) fanden heraus, daß das Vitamin B₆ am besten im pH-Bereich von 1,5 - 2, mit dem pH-Optimum von 1,7 - 1,8 extrahiert wird.

ATKIN, SCHULZ, WILLIAMS und FREY (1943) machen die optimale Vitaminausbeute nicht allein vom pH-Wert abhängig, sondern empfehlen auch, die Hydrolyse mit mindestens 180 ml Säure pro 2 - 4 μ g Vitamin B₆ durchzuführen.

Zur Frage von Dauer und Druck beim Autoklavieren schwanken die Angaben in der Literatur von 1 - 5 Std. und 15 - 20 lb. Um die Frage des Zeitfaktors auf das Ergebnis der Hydrolyse zu klären, haben BENSON, PETERS, EDWARDS und STORVICK (1964) eine Analysenprobe 0,5 - 72 Std. lang mit 0,055 n HCl bei 15 lb Druck hydrolysiert und anschließend auf Vitamin B₆ hin untersucht. Diese Untersuchung wurde mit drei verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt. Ihre Wachstumsreaktion kann aus Figur 1 entnommen werden.

Figur 1: Wachstumsreaktion von *Streptococcus faecium*, *Saccharomyces carlsbergensis* und *Lactobazillus casei* (BENSON, PETERS, EDWARDS und STORVICK 1964)

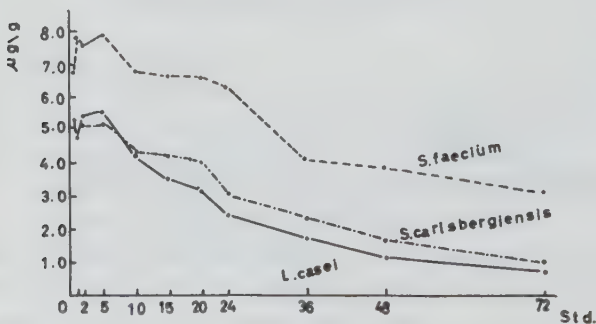


Das Ergebnis zeigt:

- Lactobazillus casei, Streptococcus faecium und Saccharomyces carlsbergiensis zeigen eine unterschiedliche Wachstumsreaktion im quantitativen Verhältnis von etwa 1:30:60
- Die Wachstumsreaktion der Mikroorganismen läßt erkennen, daß zwischen der 1 - 24 Std. die Vitamin B₆-Freisetzung ansteigt und zwischen der 36. und 72. Std. einen konstanten Wert annimmt.

2.1.2.2. Die unterschiedliche Wachstumsreaktion dreier Mikroorganismen bei ein und demselben Hydrolysat wirft die Frage auf, ob als Maßstab für die optimal durchgeführte Extraktionstechnik eine maximale Freisetzung der Vitaminkomponenten angesehen werden kann, oder ob irgendwelche möglichen Störfaktoren während der Hydrolyse auftreten können. STORVICK und McLEOD PETERS (1964) konnten an Hand einer Untersuchung zeigen, daß Störfaktoren das Ergebnis einer Extraktion beeinflussen können. Aus der Figur 2 ist zu ersehen, daß nach 5stündiger Hydrolysedauer die Wachstumsreaktion von Streptococcus faecium, Saccharomyces carlsbergiensis und Lactobazillus casei kontinuierlich abnimmt, bis sie nach 72 Std. nur noch 10 % des ursprünglichen Wertes beträgt.

Figur 2: Abnahme der Wachstumsreaktion von Streptococcus faecium, Saccharomyces carlsbergiensis und Lactobazillus casei (STORVICK und McLEOD PETERS 1964)



In einem weiteren Versuch wurde ein 20 Stunden Blutserumhydrolysat, in welchem sie mit *Saccharomyces carlsbergiensis* kein Vitamin B₆ mehr nachweisen konnten, mit einem Ionenaustauscher gewaschen. In dem gewonnenen Eluat konnten sie anschließend mit *Saccharomyces carlsbergiensis* 25 m/ug Vitamin B₆ nachweisen.

Als Ergebnis ihrer Untersuchung stellten sie fest, daß während der Hydrolyse freigesetztes Vitamin B₆ mit freien Aminosäuren und anderen Hydrolyseprodukten kondensieren können, aber auch durch die Hydrolyse Stoffe freigesetzt werden können, welche die anschließende quantitative Bestimmung stören.

2.1.2.3. SNELL (1951) empfiehlt die sauren Extraktionsverfahren nach der Methode von ATKIN, SCHULTZ, WILLIAMS und FREY (1943) und RUBIN, SCHEINER und HIRSCHBERG (1947) und RABINOWITZ und SNELL (1947 a) in gleichem Maße. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) übernehmen diese Verfahren und stellen ihrerseits eine Modifizierung aus ihrem Labor gegenüber. Diese Extraktionsverfahren sollen kommentarlos übernommen und in der folgenden Tabelle zusammengestellt werden. Tabelle 3 zeigt einen Überblick über bewährte Extraktionsmethoden in Bezug auf Art und Konzentration der Säure, Druck und Dauer des Autoklavierens und der Menge der verwendeten Säure pro vermuteter Menge an Vitamin B₆.

Tabelle 3: Bewährte Extraktionsmethoden der sauren Hydrolyse

Autor	Säure	Säure/Vitamin B ₆	Extraktion
ATKIN, SCHULTZ, WILLIAMS und FREY (1943)	0,44n H ₂ SO ₄	180ml/2-4/ug	1h/201b
RUBIN, SCHEINER und HIRSCHBERG (1947)	0,055n H ₂ SO ₄		3h/201b
RABINOWITZ und SNELL (1947 a)	0,055n HCl	180ml/2/ug	5h/201b
STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)	0,055n HCl		5h/151b

2.1.2.4. WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) extrahieren PALP aus tierischem Gewebe mit HPO_3 , um es anschließend enzymatisch mit Apotryptophanase zu bestimmen. Nach GAILANI (1965) hat sich dieses Verfahren nicht bewährt, da die PALP-Lösung durch die Extraktion mit HPO_3 40 % ihrer ursprünglichen Aktivität verliert.

2.1.3. Alkalische Hydrolyse

DONALD und FERGUSON (1964) führen die Extraktion von PALP aus Leukozyten und Leber zur enzymatischen Bestimmung mit Apotryptophanase in alkalischer Hydrolyse durch. Hierbei wird die Analysenprobe 5 Minuten in 0,5 N KOH gekocht und anschließend mit einer gleichen Menge H_3PO_4 neutralisiert.

2.1.4. Enzymatische Hydrolyse

Zur Durchführung der enzymatischen Hydrolyse verwenden BINA, THOMAS und BROWN (1943) die Enzyme Papain und Takadiastase, BAKER und SOBOTKA (1962) Clarase.

BINA, THOMAS und BROWN (1943) hydrolysieren die Analysenprobe mit 0,04 N H_2SO_4 bei 15 lb 30 Minuten vor. Anschließend wird die Probe mit der Enzymlösung, welche beide Enzyme zu gleichen Teilen enthält, 2 Stunden lang bei 40°C bebrütet.

BAKER und SOBOTKA (1962) beschreiben die enzymatische Hydrolyse von Blutserum und Gewebe. 1 ml Blut wird auf pH 6,1 eingestellt und 30 Minuten lang auf 118 - 121° erhitzt. Anschließend wird die Lösung mit 3 ml einer Claraselösung versetzt, welche 1,5 mg Enzym enthält. Die Mischung wird 3 Tage lang bei 37°C bebrütet. Leber oder Hirngewebe werden homogenisiert. Die Gewebelösung wird in einer Konzentration von 1mg/ml Trockensubstanz mit der Enzymlösung der oben beschriebenen Konzentration 3 Tage bei 37°C bebrütet.

2.2. Die Auftrennungsverfahren

2.2.1. Bedeutung der Chromatographie für die Vitamin B₆-Bestimmung

Mit der Verfeinerung chromatographischer Methodiken und der Entwicklung vom biologischen Test weg zu differenzierteren Nachweismethoden, hat die Chromatographie zunehmende Bedeutung bei der Vitamin B₆-Bestimmung erlangt. Wie die Hydrolyse ist auch die Chromatographie als Vorbestimmungsmethode als ein integrierter Bestandteil der Systematik der Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden anzusehen.

2.2.1.1. Erstens werden durch chromatographische Methoden störende Substanzen vor der Bestimmung ausgeschaltet, womit die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit des Nachweises erhöht werden. So hat POLANSKY (1969 in einer vergleichenden Untersuchung hydrolytische Auszüge von Lebensmitteln sowohl chromatographiert, als auch unchromatographiert mit *Saccharomyces carlsbergiensis* auf Vitamin B₆ hin untersucht. Hierbei lassen sich teilweise beachtliche Schwankungen in den Endergebnissen feststellen. Zweitens können die Komponenten des Vitamin B₆-Komplexes so aufgetrennt werden, daß ihre Einzelbestimmungen möglich werden. Drittens sind genaueste analytische Methoden, die Massen-, die Infrarot- und die Kernresonanzspektroskopie ohne eine vorgeschaltete gaschromatographische Auftrennung nicht denkbar. Eine umfangreiche Literatur beschäftigt sich ausschließlich mit dem Problem der chromatographischen Auftrennung des Vitamin B₆.

2.2.1.2. Chromatographische Verfahren werden bei STROHECKER und HENNING (1963), GSTIRNER (1965), STORVICK und McLEOD PETERS (1964) und KNOBLOCH (1963) aber auch als eigentliche Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden beschrieben. Dieses spricht zwar für einen hohen Entwicklungsstand der Chromatographie - man kann nach autographischer Identifizierung mit Hilfe der R_f-Werte die Reihenfolge einer Zusammensetzung mit großer Sicherheit bestimmen - doch ist diese Methode zu unspezifisch, daß sie allein als Bestimmungsmethode angesehen werden kann.

2.2.1.3. Um ein Auftrennungsverfahren beschreiben zu können, sind Angaben über Versuchstechnik, Wirksamkeit der Separationsfunktion, Phasenaufbau der Trennschicht, mechanischer Aufbau der Trennschicht und zusätzliche Maßnahmen zur Unterstützung der Trennung erforderlich. Entsprechend bietet HRAPIA (1965) mehrere Vorschläge zur Systematik der Trennungsmethode an. Die Beschreibung der Trennverfahren kann in dieser Arbeit nur in loser Anlehnung an diese Systematikvorschläge erfolgen, weil sich in Bezug auf die Vitamin B₆-Bestimmung eine eigene Ordnung der Auftrennungsverfahren herausentwickelt hat. Die Trennungsmethoden des Vitamin B₆ sollen in der folgenden Reihenfolge besprochen werden:

- a) Ionenaustauschchromatographie
- b) Papierchromatographie
- c) Dünnschichtchromatographie
- d) Elektrophorese
 - Papierelektrophorese
 - Säulenelektrophorese
 - Dünnschichtelektrophorese
- e) Gaschromatographie

2.2.2. Ionenaustauschchromatographie

2.2.2.1. Die Ionenaustauschchromatographie ist in der anorganischen und organischen Chemie zu einem unentbehrlichen analytischen und präparativen Hilfsmittel geworden. Sie ist ihrem Wesen nach eine Flüssig- Festchromatographie, bei der die reversible Fixierung an der festen Phase durch stöchiometrischen Austausch von Ionen erfolgt. Die mobile Phase ist in jedem Falle ein Elektrolyt. Die Austauschreaktion strebt ein Austauschgleichgewicht an, welches sich wie das Verteilungs- oder Adsorbtionsgleichgewicht der anderen chromatographischen Verfahren verhält.

2.2.2.2. Die Ionenaustauschchromatographie des Vitamin B₆-Komplexes wird hauptsächlich als Säulenchromatographie durchgeführt. KLOTZ und HÜTTENRAUCH (1963) und PARDINI und ARGOUEDELIS (1968) trennen Vitamin B₆ in Multivitaminpräparaten

papierchromatographisch an Ionenaustauschpapieren.

Synthetische Ionenaustauschharze, die je nach Hersteller Trivialnamen tragen, dienen als "Matrix". YAMADA und SAITO (1965) beschreiben die Trennung des Pyridoxin an TEAE- und DEAE-Cellulose. Diese Cellulose-Ionenaustauscher unterscheiden sich erheblich von Ionenaustauschern mit Kunstharzmatrix. Die austauschaktiven Gruppen liegen nahe der Oberfläche und sind somit Molekülen beliebiger Größe zugänglich (HRAPIA 1965). Damit haben Cellulose-Ionenaustauscher für große Moleküle eine höhere Austauschkapazität als Kunstharzaustauscher. Je nach aktiver Gruppe unterscheiden wir Anion- und Kationaustauscher. Kationaustauscher werden von SWEENEY und HALL (1952) und BROWN, BINA und THOMAS (1945) zur Abtrennung von Verunreinigungen aus Pyridoxinlösungen und von Mac ARTHUR und LEHMANN (1959) zur Trennung der einzelnen Glieder der Vitamin B₆-Gruppe verwendet. Sollen Pyridoxinderivate von Vitamin C pharmazeutischen Präparaten und von Pyridoxsäure im Urin getrennt werden, so setzen JINDRA (1959/60) und FUJITA, FUJITA und FUJINO (1955 b) Anionenaustauscher ein. Ionenaustauschharze unterscheiden sich zusätzlich in der Größe des Granulats. Die Partikelgröße wird in "mesh" angegeben: (siehe Tabelle 4)

Tabelle 4: Verhältnis zwischen Partikelgröße (mesh) und dem Durchmesser in mm

<u>mesh</u>	<u>mm Ø</u>
20 - 50	0,84 - 0,297
50 - 100	0,297 - 0,149
100 - 200	0,149 - 0,074
200 - 400	0,074 - 0,038
> 400	< 0,038

Für die Partikelgröße des Granulats gilt allgemein: je kleiner der Durchmesser, desto schneller ist die Gleichgewichtseinstellung, desto größer ist der Wirkungsgrad des Austausches und desto langsamer erfolgt der Durchlauf der Lösung durch die Säule.

2.2.2.3. SNELL (1963) hat sich mit dem Verhalten des Pyridoxin an der Ionenaustauschsäule auseinandergesetzt. In wässriger Lösung besitzen die Vitamin B₆-Derivate, abhängig vom pH-Wert, der Temperatur und anderen Faktoren, sechs mögliche ionisierbare Gruppen.

Die pK-Werte der Vitamin B₆-Gruppe sind in der nachstehenden Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: pK-Werte der Vitamin B₆-Gruppe

Vitamin B ₆	pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄
POL	5,00	8,96-8,97		
PAL	4,20-4,23	8,66-8,70	13,00	
PAM	3,31-3,54	7,90-8,21	10,4-10,63	
PALP	2,50	4,14	6,20	8,69
PAMP	2,50	3,25-3,69	5,76	8,61

Diese pK-Werte unterscheiden sich nur geringfügig voneinander, so daß man vorhersagen kann, daß eine einwandfreie Trennung Schwierigkeiten bereiten wird. Die Entwicklung geeigneter chromatographischer Methoden wird zusätzlich dadurch erschwert, daß sich die Substanzen nicht so auswaschen lassen, wie man auf Grund ihrer pK-Werte vermuten könnte. So muß man sich bei der Entwicklung geeigneter Trennungsmethoden hauptsächlich auf empirisch gefundene Werte stützen.

2.2.2.4. Es überrascht deshalb nicht, daß eine Vielzahl von einander abweichender Trennungsmethoden beschrieben worden sind. Die Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der verwendeten Ionenaustauschharze und ihrer Trennungsaufgabe.

2.2.3. Papierchromatographie

2.2.3.1. Die Papierchromatographie ist eine der am meisten benützten Mikromethoden der analytischen Stofftrennung. Sie erzielt mit einfachen Mitteln sehr gute Trennerfolge (HRAPIA 1965). Sie ist im Prinzip eine Verteilungschromatographie,

Tabelle 6: Übersicht über verschiedene Trennungsaufgaben und den dabei verwendeten Ionenaustauschern

Autor	Trennungsaufgabe	Ionenaustauscher
FUJITA, MATSURA, FUJINO 1955	PAL und PAM im Gewebe	Permutit 60-80 mesh
FUJITA, FUJITA, FUJINO 1955 b	PXS im Urin	Amberlite IRA-410
FUJITA, FUJINO 1955	PAL im Urin	Amberlite IRC-50
FUJITA, FUJITA, FUJINO 1955 b	PAL im Gewebe und Blut	Amberlite IR-112
PETERSON, SOBER 1954	alle Vitamin B ₆ -Derivate in pharmazeutischen Präparaten	Amberlite XE-60
REDDY, REYNOLDS, PRICE 1958	PXS im Urin	Dowex 1
REDDY, REYNOLDS, PRICE 1958	PXS im Urin	Dowex 50
TOEPPER, LEHMANN 1961	POL, PAL und PAM in Nahrungsmitteln	Dowex AG-50 WX-8
HENNESSY, STEINBERG, WILSON, KEAVENEY 1960	POL in Weizenmehl und Brot	Decalso

Autor	Trennungsaufgabe	Ionenaustauscher
SPOREVIC, EDWARDS, BENSON, WOODRING 1963	POL, PAL, PAM, PKS	Dowex 1, Dowex 50
SIROHECKER, HENNING 1963	POL in pharmazeutischen Präparaten	Ionenaustauscher IV (Merck)
FUKUI 1953	POL, PAL, PAM in pharma- zeutischen Präparaten	KH 4 B und Duolite 60
JINDRA 1959/60	POL, Vitamin C in pharma- zeutischen Präparaten	Amberlite IR-4b und Amberlite IRA-401
Mac ARTHUR POLANSKY, MURPHY, TOEPFER 1964	POL, PAL, PAM in Getreide	Dowex AG-50 WX 8
KLOTZ, POETHKE 1964	POL in pharmazeutischen Präparaten	Wofatit Cp 300, Amberlite XE-100 Amberlite IR-401 Wofatit L 150
YAMADA 1965	PALP in pharmazeutischen Präparaten	TEAE-Cellulose DEAE-Cellulose

wobei das mit Wasser, oder einem hydrophilen Lösungsmittel gesättigte Papier die stationäre Phase darstellt; die mobile Phase wird durch die organische, weniger polare Lösungsmittelfront gebildet. Ohne mit den Phasen zu reagieren, verteilen sich die zu untersuchenden Substanzen zwischen den beiden Phasen so, daß das Verhältnis ihrer Konzentrationen in beiden Phasen konstant ist. KLOTZ und HÜTTENRAUCH (1963) und PARDINI und ARGOUEDELIS (1968) verwenden zur Auftrennung der Vitamin B₆-Komponenten Ionenaustauschpapier. Bei diesen Papieren besitzt die stationäre Phase als zusätzliche Trennfunktion den Ionenaustauschmechanismus.

2.2.3.2. Aufbau des Systems

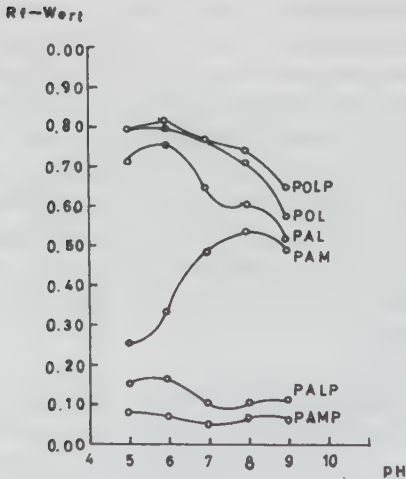
2.2.3.2.1. Die Papierchromatographie des Vitamin B₆ wird in auf- und absteigender Arbeitsmethode ein- und zweidimensional durchgeführt. Eine Reihe von Papiersorten finden Verwendung. Diese Papiere sind durch Flächengewicht, Dichte und Saughöhe charakterisiert. Whatman 1 ist das Standardpapier, aber auch Whatman 3, 3 MM Schleicher Schuell Nr. 507, 598, 2043 A und Munktell OB Papiere finden Verwendung. PARDINI und ARGOUEDELIS (1968) verwenden Amberlite SA 2 zur Trennung von Pyridoxin, Pyridoxal und Pyridoxamin. KLOTZ und HÜTTENRAUCH (1963) trennen POL von anderen Derivaten der Vitamin B₆-Gruppe mit Amberlite SB 2 und WA 2 ab.

2.2.3.2.2. Das wichtigste Problem der Papierchromatographie bleibt das Lösungsmittelsystem. Zur Erzielung brauchbarer Ergebnisse ist man auf die Versuchsreihe angewiesen. Trotz umfangreicher Erforschung der Lösungsmittelsysteme ist die Trennung aller Vitamin B₆-Formen noch lange nicht perfekt (STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING 1964).

2.2.3.2.3. Eine Reihe von Parametern sind für den Erfolg und Reproduzierbarkeit der papierchromatographischen Auftrennung verantwortlich: stationäre Phase, mobile Phase, Temperatur, Dauer der Entwicklung, Fließmittelrichtung und Konzentration der Probe. GUSTAVSON, LEDIN und FÜRST (1966) haben die Ab-

hängigkeit des Rf-Wertes vom pH-Wert für POL, PAL, PAM, POLP, PALP und PAMP untersucht. Sie chromatographierten Proben der oben genannten Substanzen in wassergesättigter Pyridin-Butanol-Lösung (1:2) auf Whatman 1 Papier. Der pH-Wert wurde durch HCl und NH_4OH auf 5, 6, 7, 8 und 9 eingestellt. Die Figur 4 zeigt den Verlauf der Rf-Werte für den pH-Bereich von 5 bis 9.

Figur 4: Verlauf der Rf-Werte von POL, PAL, PAM, POLP, PALP und PAMP für den pH-Bereich von 5 bis 9 (nach GUSTAVSON, LEDIN und FÜRST 1966)



2.2.3.3. Methoden und erhaltene Rf-Werte werden in der Tabelle 7 nach Autoren geordnet schematisiert wiedergegeben.

Tabelle 7: Zusammenstellung bewährter Methoden der papierchromatographischen Auftrennung, nach Autoren geordnet

GUSTAVSON, LEDIN und FÜRST (1966) untersuchen die Auftrennung von Vitamin B₆-Derivaten in Abhängigkeit ihres pH-Wertes auf Whatman Nr.1-Papier.

Trennmittel	pH	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:					
		POL	PAL	PAM	POLP	PALP	PAMP
Pyridin,	5	79	71	25	79	15	8
Butanol (1:2)	6	79	75	33	80	16	7
Wasser gesättigt	7	76	64	48	76	10	5
	8	71	60	53	73	10	7
	9	57	51	49	64	11	6

HAKANSON (1964) untersucht die Auftrennung von Vitamin B₆-Derivaten mit Hilfe verschiedener Trennmittel auf Whatman Nr.1-Papier

Trennmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:				
	POL	PAL	PAM	PALP	PXS
I. n-Butanol gesättigt mit N-HCl	48	78 (42)	9	70	61
II. n-Butanol gesättigt mit Wasser	55	58	10	13	50
III. n-Butanol gesättigt mit N-Ammoniak	42	39	30	2	65
IV. Methanol-Butanol-Benzol-Wasser (2:1:1:1)	75	76	42	63	73
V. Isopropanol-Ammoniak-Wasser (20:1:2)	41	40	27	0	74

PARDINI und ARGOUDELIS (1968) trennen freies Vitamin B₆ mit verschiedenen Trennmitteln auf Whatman Nr.1 und 3-Papier oder Amberlite SA-2.

Trennmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:		
	POL	PAL	PAM
I. t-Amylalkohol-Aceton-Wasser-Salmiaklsg. (conc.) (40:35:20:5)	45	65 (83)	88
II. t-Butylalkohol-Aceton-Wasser-Eisessig (40:35:20:5)	69	76	35
III. n-Butylalkohol gesättigt mit Wasser	58	55	9

FASELLA, LIS, SILIPRANDI und BAGLIONI (1957) trennen Vitamin B₆-Derivate auf Munktell O.B.-Papier auf.

Trennmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:				
	POL	PAL	PAM	PALP	PAMP
n-Propanol-Ameisensäure 10 %ig (4:1)	70	66	30	17	6

PUSZTAI (1954) trennt Vitamin B₆-Derivate in absteigender Papierchromatographie auf Schleicher und Schuell 2043 A-Papier.

Trennmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:				
	POL	PAL	PAM	POLP	PXS
Äthylacetat-Pyridin-Wasser (2:1:2)	94	85	65	56	76

PETERSON und SOBER (1954) trennen Vitamin B₆-Derivate auf Whatman Nr.1 (W-1) und Schleicher und Schuell 598 (SS-598) Papieren.

Trennmittel	Papier	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:		
		POL	PAL	PAM
Ameisensäure-	W-1	74-89	70-80	58-69
Mischung	SS-598	80-88	78-88	40-58
Lutidin-	W-1	78-83	83-90	58-65
Mischung	SS-598	76-80	82-87	60-66

Trennmittel	Papier	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:		
		POLP	PALP	PAMP
Ameisensäure-	W-1	47-52	33-42	20-30
Mischung	SS-598	56-62	42-52	24-36
Lutidin-	W-1		16-22	2- 8
Mischung	SS-598	3-11	26-31	0- 6

FUKUI und SAKAZAWA (1955) trennen Vitamin B₆-Derivate auf.

Trennmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:		
	POL	PAL	PAM
n-Butanol bei pH 6,0	54	39	4

RODWELL, VOLCANI, IKAWA und SNELL (1958) trennen Vitamin B₆-Derivate in aufsteigender Papierchromatographie auf Whatman Nr.1-Papier.

Trennmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:		
	POL	PAL	PAM
I. Wasser-Aceton- Butanol-Diäthylamin (4:7:8:1)	31	64	70
II. Wasser-Aceton- Butanol-Eisessig (4:7:8:1)	57	60	20

BURG, RODWELL und SNELL (1960) trennen Vitamin B₆-Derivate in aufsteigender Papierchromatographie auf Whatman Nr.1-Papier.

Trennmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate:		
	POL	PAL	PAM
I. Amylalkohol-Aceton- Wasser-Diäthylamin (8:7:4:1)	36	68	73
II. Amylalkohol-Aceton- Wasser-Benzylamin (8:4:7:1)	58	87	72

2.2.4. Dünnschichtchromatographie

2.2.4.1. Die in den letzten Jahren entwickelte Dünnschichtchromatographie ist eine Bereicherung der analytischen Methode und hat sich für den organischen Chemiker und Biochemiker als unentbehrlich erwiesen. Sie wurde ursprünglich als Spezialverfahren zur Trennung von Terpenen angewendet, bis durch STAHL die allgemeine Aufwendbarkeit aufgezeigt und das Verfahren standardisiert wurde (HRAPIA 1965). Heute wird die Dünnschichtchromatographie zur Trennung sowohl hydrophiler als auch lipophiler Substanzen angewandt. Bei der Trennung hydrophiler Substanzen ist sie der Papierchromatographie ebenbürtig, bei der Trennung lipophiler Substanzen ist sie der Papierchromatographie weit überlegen (HRAPIA 1965). Die charakteristischen Vorteile der Dünnschichtchromatographie sind: Trennschärfe, hohe Empfindlichkeit, Schnelligkeit, freie Wahl der Indikatoren, weil die meisten Adsorbentien weitgehend chemikalienresistent sind und breite Variabilität der stationären Phase (HRAPIA 1965).

Es ist nicht verwunderlich, daß NÜRNBERG erst 1961 eine dünn-schichtchromatographische Methode zur Trennung von freiem Vitamin B₆ vorstellte. BOLLINGER (1967), YAMADA und SAITO (1965), CONTRACTOR und SHANE (1969) und AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970) stellen dünn-schichtchromatographische Trennungsmethoden für die Vitamin B₆-Gruppe und Analoga in verschiedenen stationären und mobilen Phasen vor.

2.2.4.2. Die Wahl des geeigneten Laufmittels und der Adsorptionsschicht kennzeichnen den Aufbau eines dünn-schichtchromatographischen Systems.

2.2.4.2.1. Adsorbentien der Dünnschichtchromatographie sind Kieselgele, Aluminiumoxyde, Stärke und Cellulose, rein oder miteinander vermischt. Fluoreszierende Substanzen können beigemischt sein. Kein Autor führt jedoch eine dünn-schichtchromatographische Trennung von Vitamin B₆ an Polyäthylenen und Poliamiden durch, obwohl sie als Adsorbentien von Phenolen und Estern von FLORKIN und STOTZ (1962) empfohlen werden.

Als Besonderheit untersuchen AHRENS und KORYTNYK (1969) folgende Ionenaustauschcellulosen als Adsorbentien für Vitamin B₆:

- MN Cellulose 300 G DEAE
- MN Cellulose 300 PEA
- MN Cellulose 300 G Ecteola

Sie stellen als Ergebnis fest, daß Ionenaustauschcellulosen auf dem Gebiet der Dünnschichtchromatographie keine Vorteile gegenüber den gewöhnlichen Cellulosen besitzen.

2.2.4.2.2. Oben genannte Autoren arbeiten mit einer Reihe von Laufmittelkombinationen. Das geeignete Laufmittel muß dabei für eine bestimmte Adsorptionsschicht abhängig von der Trennungsaufgabe empirisch gefunden werden. Während NÜRNBERG (1961) noch empfiehlt, die Trennung von POL, PAL und PAM in zwei Läufen mit zwei verschiedenen Laufmitteln durchzuführen, hat sich bei AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970), YAMADA und SAITO (1965) im allgemeinen die Technik eines einzigen Laufes durchgesetzt. Als Laufdauer werden 1 - 4 Stunden angegeben.

2.2.4.3. Bei der Trennung der nicht phosphorylierten Form des Vitamin B₆ (POL, PAL, PAM, 4 PXS und Pyridoxolacton) und der Trennung von POLP, PALP und PAMP treten bei allen Autoren Schwierigkeiten auf.

2.2.4.3.1. Damit sich POL und PAL gut voneinander trennen lassen, wandelt NÜRNBERG (1961) PAL in PAL-Acetal, AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970) in PAL-Äthylacetal um. POL und die acetylierte Form von PAL lassen sich dann gut trennen. Eine weitere Trennungshilfe von POL und PAL ist die Behandlung der dünnschichtchromatographischen Schicht mit H₃BO₃ nach AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970). Pyridoxol bildet nämlich mit Borsäure einen Komplex, der am Startpunkt liegen bleibt.

2.2.4.3.2. PALP zerfällt bei Tageslicht zu 95 % innerhalb einer Stunde. In der Dünnschicht- und Papierchromatographie resul-

tiert daraus eine Streifenbildung. Dieses sogenannte "tailing" wird dadurch unterdrückt, daß PALP durch Phenylhydrazin-semicarbacid oder Hydroxylamin stabilisiert wird. AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970) empfehlen die Auftrennung von PALP als PALP-Phenylhydrazon.

2.2.4.3.3. Als Besonderheit der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von Vitamin B₆ hat HÜTTENRAUCH (1966) die R_f-Werte von polymeren Vitamin B₆ untersucht, wie sie beim Erhitzen wässriger und fast neutraler Pyridoxollösungen entstehen können. Er benützte die Methode nach NÜRNBERG (1961) und fand heraus, daß der R_f-Wert des Vitamin B₆ mit steigender Polymerisationsstufe abnimmt.

2.2.4.4. Methoden der dünnschichtchromatographischen Trennung und erhaltene R_f-Werte werden in der Tabelle 8 nach Autoren geordnet schematisiert wiedergegeben.

Tabelle 8: Bewährte Methoden der Dünnschichtchromatographie nach Autoren geordnet.

NÜRNBERG (1961) trennt POL, PAL und PAM dünnschichtchromatographisch mit Hilfe der sogenannten Zweistufentechnik auf. Zur Trennung von PAL und POL wird PAL nach dem ersten Lauf in PAL-Methylacetal umgewandelt. Die Trennschicht ist Kieselgel.

Laufmittel	R _f -Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate		
	POL	PAL	PAM
a) Aceton			
b) Aceton-Dioxan- Ammoniaklösung 25 % (9:9:1)	30	45	60

BOLLINGER (1967) trennt die Vitamin B₆-Derivate mit Hilfe verschiedener Laufmittel und Trennschichten auf.

Laufmittel: I. Ammoniak 0,2 %
 II. Aqua dest
 III. Dioxan-Wasser (7:3)
 IV. n-Butanol-1 N Essigsäure (83:17)

Trennschichten: A. Kieselgel G oder GF₂₅₄
 B. Cellulose-Pulver (über 300 mesh)

Lauf- mittel	Trenn- schicht	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate			
		POL	PAL	PAM	PALP
I.	A.	53	52	16	75
II.	A.	52	51	19	64
III.	B.	83	83	19	51
IV.	B.	73	85	22	26

AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970) untersuchen die Auftrennung verschiedener Vitamin B₆-Derivate mit Hilfe verschiedener Trennmittel und Trennschichten.

Laufmittel: I. 0,2 % Ammoniaklösung
 II. Chloroform-Methanol (3:1 v:v)
 III. n-Butanol gesättigt mit 1 N HCl
 IV. n-Butanol-HCl, conc.-Wasser (5:1:2 v:v)
 V. Methanol-Butanol-Benzin-Wasser-Triäthylamin (4:2:2:2:1 v:v)
 VI. Methyläthylketon-Äthanol-Ammoniak conc.-Wasser (3:1:1:1 v:v)
 VII. n-Butanol-Essigsäure-Wasser (3:2:2 v:v)

Trennschichten: A. Kieselgel HF₂₅₄
 B. Cellulose MN 300 G
 C. Chromagram 6065, Eastman Kodak

Lauf- mittel	Trenn- schicht	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate					
		POL	PAL	PAM	POLP	PALP	PAMP
I.	A.	62	68	12	95	95	86
II.	A.	47	56	05	00	00	00
II.	A.		36	05			
VI.	A.				30	54	41
VI.	A.				18	33	28
III.	B.				47	64	07
IV.	B.				68	80	36
VII.	B.				70	78	62
III.	C.				21	37	01
V.	C.				69	79	57

YAMADA und SAITO (1965) untersuchen die Trennung verschiedener Vitamin B₆-Derivate mit Hilfe verschiedener Laufmittel auf Cellulosepulver.

Laufmittel	Rf-Werte (x100) der Vitamin B ₆ -Derivate			
	POL	PAL	PAM	PALP
Äthanol-Wasser (9:1)	85	80	16	0
Äthanol-Wasser (8:2)	84	86	20	0
n-Propanol-Wasser (5:1)	88	86	39	24
n-Propanol-Wasser (9:1)	75	77	19	8
n-Butanol gesättigt mit Wasser	86	81	18	15
Iso-Propanol-Wasser (6:1)	81	79	21	6
Aceton-Wasser (6:1)	85	83	54	92
Dioxan-Wasser (6:1)	79	82	6	0
Dioxan-Wasser (3:1)	83	83	17	32
Dioxan-Wasser (2:1)	83	88	15	68
Dioxan-Wasser (7:3)	83	83	19	51

Laufmittel	Rf-Werte (x 100) der Vitamin B ₆ -Derivate			
	POL	PAL	PAM	PALP
85% Äthanol-28% NH ₄ OH (20:1)	76	73	57	3
90% Äthanol-0,2 N Essigsäure (20:1)	79	82	28	23
n-Propanol-Aceton-n-Butanol- Wasser (2:2:2:1)	84	80	36	13
n-Propanol-Aceton-Dioxan- Wasser (13:2:2:3)	89	89	34	21
n-Propanol-Aceton-Wasser (10:6:3)	93	91	51	29
n-Butanol-0,2 N Essigsäure (5:1)	84	86	22	25
n-Butanol-1N Essigsäure (5:1)	73	85	22	26
n-Butanol gesättigt mit Wasser-Pyridin (5:1)	85	87	18	7
Aceton-Dioxan-25% NH ₄ OH (9:9:2)	32	33	70	0

2.2.5. Elektrophorese

Elektrophorese ist die Wanderung echt oder kolloidal gelöster Teilchen im elektrischen Feld. Als Abgrenzung zur Elektrolyse werden die wandernden Teilchen bei der Elektrophorese nicht abgeschieden, so daß sie oxydiert oder reduziert werden. Die Elektrophorese trennt nicht nur Ionen, sondern auch amphotere Substanzen und geladene Kolloide.

2.2.5.1. Wanderungsrichtung und Wanderungsgeschwindigkeit charakterisieren die elektrophoretische Trennung. Die Wanderungsrichtung wird durch den pH der Pufferlösung und durch die Ionisierung der zu trennenden Partikel bestimmt. Bei pH 5,1, wie er von COLOMBINI und McCOY (1970), SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954), FASELLA, LIS, SILIPRANDI und BAGLIONI (1957) zur Trennung von POL, PAL, PAM, POLP, PALP und PAMP verwendet wird, wandern POLP, PALP und PAMP von der Startlinie zur Anode, POL, PAL und PAM zur Katode.

Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt einerseits von der Teilchenladung und der Feldstärke, andererseits von dem Durchmesser und der Masse der Teilchen und der Viskosität des Mediums ab. Die Laufzeiten der Papierelektrophorese betragen bei SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954) und GREGORY und MABBIT (1961) bei einer Stromdichte von 3,5 mA und 6-7 mA ca 5-6 h. Die Laufzeiten der Dünnschichtelektrophorese betragen bei COLOMBINI und McCOY (1970) 3 - 4 Stunden und bei AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970) bis 55 Minuten.

2.2.5.2. Analog der bekannten chromatographischen Arbeitsweisen werden zur Vitamin B₆-Bestimmung Papier-, Säulen- und Dünnschichtelektrophorese beschrieben.

2.2.5.2.1. SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954) und GREGORY und MABBIT (1961) beschreiben Methoden der papierelektrophoretischen Trennung des Vitamin B₆-Komplexes.

Tabelle 9: Bewährte Methoden der Papierelektrophorese

SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954) führen die elektrophoretische Trennung auf Munktell 20-Papier durch

Analysenprobe	Puffersystem	Stromstärke	Zeit	Bemerkung
POL	0,05 m Acetat-Puffer, pH 5,1	3,5 mA	6-7 h	gute Trennung der 5 Komponenten
PAL				
PAM				
PALP				
PAMP				

GREGORY und MABBIT (1961) führen die elektrophoretische Trennung auf Whatman 1-Papier durch

Analysenprobe	Puffersystem	Stromstärke	Zeit	Bemerkung
PAL	0,05 m Acetat-Puffer, pH 5,8	6-7 mA		gute Trennung der Komponenten
PAM				
PALP				
PAMP				

2.2.5.2.2. Methoden der Säulenelektrophorese wurden von SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954) und FASELLA, LIS, SILIPRANDI und BAGLIONI (1957) zur Trennung größerer Mengen des Vitamin B₆-Komplexes beschrieben. (Tabelle 10)

Tabelle 10: Methoden der Säulenelektrophorese

SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954) führen die elektrophoretische Trennung in einer Säule durch, die mit Stärke gefüllt ist.

Analysenprobe	Puffersystem	Stromstärke	Zeit	Bemerkung
POL	0,05	18 mA	14 h	Trennung der 5 Komponenten waren nicht einwandfrei möglich
PAL	Acetat-Puffer pH 5,1			
PAM				
PALP				
PAMP				

FASELLA, LIS, SILIPRANDI und BAGLIONI (1957) führen die elektrophoretische Trennung in einer Säule durch, die mit Cellulose gefüllt ist.

Analysenprobe	Puffersystem	Stromstärke	Zeit	Bemerkung
a) POL	0,05 M Tri-äthylaminacetatpuffer a) pH 5,1	20 mA	50 h	keine Angaben
PAL				
PAM				
b) PALP	b) pH 5,9	20 mA	50 h	keine Angaben
POLP				
PAMP				

Nach 14 Stunden (SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS 1954) bzw. 50 Stunden (FASELLA, LIS, SILIPRANDI und BAGLIONI 1957) elektrophoretischer Trennung werden die Fraktionen mit Hilfe der verwendeten Pufferlösungen aus der Säule eluiert. Im allgemeinen

kann man sagen, daß sich die Säulenelektrophorese in der besprochenen Art zur Auftrennung des Vitamin B₆-Komplexes nicht bewährt hat. SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954) gelingt mit dieser Methode keine vollständige Trennung des Vitamin B₆-Komplexes. Der zeitliche und apparative Aufwand rechtfertigen dieses unsichere Ergebnis nicht, zumal weit einfachere Systeme eine schnellere und sichere Analyse gewähren.

2.2.5.2.3. AHRENS und KORYTNYK (1969, 1970) beschreiben die dünnschichtelektrophoretische Trennung des Vitamin B₆ in pharmazeutischen Präparationen, COLOMBINI und McCOY (1970) die Trennung von Vitamin B₆ in Gewebsextrakt von Mäusen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Papier- und Dünnschichtchromatographie gelingt ihnen in kurzer Zeit mit Hilfe der Dünnschicht-Elektrophorese die klare und charakteristische Trennung aller Vitamin B₆-Komponenten, lediglich über die Wahl des geeigneten Dünnschichtträgers, der Pufferstärke und der Stromdichte. Die Dünnschicht-Elektrophorese ist demnach ein sehr geeignetes Mittel der Vorbestimmung beim Vitamin B₆-Nachweis (Tabelle 11).

2.2.6. Gaschromatographie

2.2.6.1. Die Gaschromatographie ist die jüngste Arbeitsmethode der chromatographischen Analyse. Sie unterscheidet sich von anderen chromatographischen Techniken dadurch, daß die Probe statt im flüssigen Laufmittel gelöst, sich als gasförmige Phase im Trägergas befindet. Gaschromatographische Trennoperationen sind seit 1951 bekannt. Die gaschromatographische Abtrennung des Vitamin B₆ wird von KORYTNYK, FRICKE und PAUL (1966) zum ersten Mal beschrieben.

2.2.6.2. Die zur Gaschromatographie verwendeten Apparatur, der Gaschromatograph besteht aus drei Hauptteilen. Über den "Analysengeber" wird die zu untersuchende Probe mit dem Trägergas durch die "Trennsäule" geführt, wodurch wiederholte Verteilung der Komponenten auf mobiler und stationärer Phase eine

Tabelle 11: Bewährte Methoden der Dünnschichtelektrophorese

AHRENS und KORYTNYK (1969 und 1970) führen die dünnsschichtchromatographische Elektrophorese für die Vitamin B₆-Derivate durch.

Trennsystem

Wanderung der Vitamin B₆-Derivate vom Startpunkt (in mm)
Anmerkung: + = Wanderungsrichtung zur Anode,
- = Wanderungsrichtung zur Katode

I. pH: 3,95	POL	PAL	PAM	PALP	PAMP	POLP
Stromstärke: 19-30 mA						
Spannung: 500 V	-54	-35	-56	+24	-11	+ 0
Dauer: 55 min						
Trägerschicht: Kieselgel						
II. pH: 4,53	-19	- 9	-34	+21	- 3	+12
Stromstärke: 28-43 mA						
Spannung: 500 V						
Dauer: 40 min						
Trägerschicht: Kieselgel						

COLOMBINI und MCCOY (1969) führen die dünn-schichtchromatographische Elektrophorese für die Vitamin B₆-Derivate durch.

Trennsystem

Wanderung der Vitamin B₆-Derivate vom Startpunkt (in mm)

Anmerkung: + = Wanderungsrichtung zur Anode,

- = Wanderungsrichtung zur Katode

	POL	PAL	PAM	POLP	PALP	PAMP
pH: 5,1						
Stromstärke: -						
Spannung: a) 750 V	-76	-13	-150	+76	+102	+25
b) 600 V						

Dauer: a) 3 h

b) 4 h

Trägerschicht: CF-1 Whatman-

Cellulose

Bemerkung: Die Autoren erhalten mit 750 V und 3 h Laufdauer und 600 V und 4 h Laufdauer die gleichen Auftrennungsergebnisse.

Trennung erzielt wird. Der der Trennsäule nachgeschaltete "Detektor" liefert das, der ankommenden Fraktion entsprechende Signal. Integraldetektoren schreiben Stufenkurven, Differentialdetektoren schreiben Glockenkurven, die auch "Peaks" bezeichnet werden. Die Fläche unter der Kurve entspricht der Menge der Fraktion. Die Tabelle 12 zeigt die von den Autoren zur Vitamin B₆-Vorbestimmung verwendeten Gaschromatographen, das verwendete Trägergas, die Füllung der Trennsäule und die Art des Detektors an.

2.2.6.3. Das natürliche Anwendungsgebiet der Gaschromatographie ist grundsätzlich die Trennung gasförmiger, unzersetzt verdampfbarer Analysenproben. Obwohl Pyridinderivate ohne weiteres gaschromatographisch aufgetrennt werden können, sind die Komponenten der Vitamin B₆-Gruppe auf Grund ihrer polaren Gruppen für die Gaschromatographie nicht flüchtig genug. Aus diesem Grund müssen sie zu Pyridoxinabkömmlingen umgewandelt werden, die ausreichend flüchtig sind. In der Literatur werden die Vitamine der B₆-Gruppe als Abkömmlinge von

- Isopropyliden
- 3-O-benzyl
- Acetyl
- Trimethylsilyl (TMS)
- Trifluoracetyl (TFA)

gaschromatographisch untersucht.

Gute Trennungserfolge erzielt man nach SHEPPARD und PROSSER (1970) mit allen diesen Abkömmlingen. Man sollte jedoch für die Routineuntersuchung in Rechnung stellen, daß die Darstellung der Abkömmlinge bei allen Konzentrationen und beliebigen Arbeitstemperaturen vollständig, schnell und mit geringem Arbeitsaufwand erfolgen muß. Weiter empfehlen die Autoren die Acetylierung der Vitamin B₆-Derivate als erfolgversprechende Methode. Die Tabelle 13 zeigt die von den Autoren verwendeten Derivate des Pyridoxin. Die Darstellungsmethoden werden bei den Autoren beschrieben.

Tabelle 12: Zusammenstellung Gaschromatographischer Systeme nach Autoren Geordnet

Autor	Modell	Füllung der Trennsäule	Detector
KORYTNYK, FRICKE, PAUL (1966) und KORYTNYK (1970)	F & M Modell 400 Biochemical Gas- chromatograph	1,2 % Silikonkautschuk SE-30 auf 80-100 mesh Chromsorb G	Wasserstoff- Flammdetektor
PROSSER, SHEPPARD, LIBBY (1967) und SHEPPARD, PROSSER (1970)	Barber-Colman Modell 10	6,67 % SE-30 und 0,33 % Neopentylglykolsuccinat auf 100-120 mesh Gas Chrom P	Wasserstoff- Flammenionisierungs- detektor
SENNELLO, ARGOUDELIS (1969)	Barber-Colman Modell 5340	15 % Dow Corning Silikon- fett auf 60-80 mesh Gas Chrom Q	Temperaturleitungs- detektor
IMANARI, TAMURA (1967)	Shimadzu Gas- chromatograph Modell GC 10		a) Wasserstoff- Flammenionisie- rungsdetektor b) Elektronenfang- detektor

Tabelle 13: Zusammenstellung der Verbindungen, mit deren Hilfe das Vitamin B₆ Gaschromatographisch aufgetrennt werden kann

Derivat	Autor	Vitamin B ₆	Bemerkung
Acetyl- derivate	KORYTNYK, FRICKE, PAUL (1966) und KORYTNYK (1970)	POL PAL PAM	Da PAL bei der Analyse mit 4-Deoxypyridoxal und 5-Pyridoxolacton interferieren kann, empfehlen die Autoren PAL entweder in das Hemiacetal zu überführen, oder es durch Borhydrid zu POL zu reduzieren.
Acetyl- derivate	PROSSER, SHEPPARD, LIBBY (1967) und SHEPPARD, PROSSER (1970)	POL PAL PAM	Die Acetylierung von Vitamin B ₆ ist diesen Autoren nach die am besten geeignete Methode.
TPA	IMANARI, TAMURA (1967)	POL PAL PAM	POL und PAM sind als TPA-Derivate stabil und verdampfbar. PAL muß vor der Acetylierung entweder in das Methyloxim oder in eine Schiff'sche Base umgewandelt werden.
TMS	SENNELLO, ARGOUDELIS (1969)	POL	POL läßt sich von Ascorbinsäure und Nikotinsäureamid als TMS-Derivat gut trennen.

Derivat	Autor	Vitamin B ₆	Bemerkung
Isopropylidenderivate	KORYTENYK, FRICKE, PAUL (1966)	POL	Isopropylidenderivate können verwendet werden, wenn die phenolische Hydroxyl- oder 4-Hydroxymethylgruppen frei sind.

Tabelle 14: Beispiele einer Gaschromatographischen Analyse nach KORYTENYK, FRICKE und PAUL (1966)

Acetylierungsprodukte	absolute Retentionszeit (min)	relative Retentionszeit
POL	8,5	1,00
PAL	3,1	2,31
PAM	19,6	0,36

2.2.6.4. Gaschromatogramme liegen im Gegensatz zu den Ergebnissen aller anderen chromatographischen Techniken immer als Registrierkurven vor. Damit sind sie nicht nur qualitativ, sondern auch unmittelbar quantitativ auswertbar.

2.2.6.4.1. Die qualitative Auswertung, die Identifizierung der "Peaks" geschieht unter dem Vergleich der Retentionszeit, der Analysensubstanz mit den ermittelten Retentionszeiten von Testsubstanzen. Die Retentionszeiten der Vitamin B₆-Derivate betragen von Autor zu Autor schwankend nur wenige Minuten. Die Retentionszeiten sind abhängig von der verwendeten Apparatur, der Wahl des Derivates, des Trägergases, Adsorptionsmittel, Arbeitstemperatur und Gasdruck. Die Tabelle 14 zeigt die Retentionszeiten der gaschromatographischen Analyse von Vitamin B₆ von KORYTNYK, FRICKE und PAUL (1966). Die Übereinstimmung der Retentionszeiten ist allerdings noch kein Identitätsbeweis.

2.2.6.4.2. Die quantitative Auswertung in der Gaschromatographie ist von der Art des verwendeten Detektors abhängig. Sie erfolgte bei den beschriebenen Methoden ausschließlich mit Hilfe von Differentialdetektoren. Bevor die Auswertung einer Analyse erfolgen kann, muß mit Hilfe von Reinsubstanzen abfallender Konzentration eine Eichkurve aufgestellt werden. Der Logarithmus der Fläche unter dem Peak wird gegen die Konzentration aufgetragen. Damit stellt eigentlich die Gaschromatographie eine Vorbestimmungs- und Bestimmungsmethode bei der Vitamin B₆-Analyse gleichermaßen dar. Die gaschromatographische Auftrennung ist aber auch die Voraussetzung dafür, daß das Vitamin B₆ zur Strukturanalyse, zum quantitativen und qualitativen Nachweis massen-, infrarot-, ultraviolett- und kernresonanz-spektrometrisch untersucht werden kann. In dieser Eigenschaft bleibt die Gaschromatographie eine Vorbestimmungsmethode im Sinne der Einleitung.

2.2.6.5. Die Gaschromatographie wird einheitlich als schnelle und einfache Methode mit hoher Spezifität und sehr guter

Reproduzierbarkeit gelobt. Mengen von weniger als $0,1/\mu\text{g}$ Vitamin B_6 können aufgetrennt werden. Es fällt aber auf, daß ihre Anwendung ausschließlich zur Auftrennung von Vitamin B_6 in Reinstsubstanzen und pharmazeutischen Präparationen beschränkt bleibt. Wird jedoch ein Hydrolysat aus biologischem Material und Nahrungsmitteln mit anderen Methoden der Chromatographie vorgereinigt, dann kann die Gaschromatographie natürlich auch als Analysenmethode nachgeschaltet werden.

3. Bestimmungsmethoden

3.1. Einführung

3.1.1. Das Vitamin B_6 ist auf Grund seiner zentralen Stellung im Eiweißmetabolismus, seiner Beteiligung am Kohlehydrat-, Fett- und Mineralstoffwechsel, wahrscheinlich das am meisten untersuchte Vitamin. Es wird von Pharmazeuten, Nahrungsmittelchemikern, Biochemikern und analytischen Chemikern mit gleich großem Interesse erforscht. Die Vitamin B_6 -Nachweismethoden werden mit vielfältigem Ziel durchgeführt. Es interessieren die Vitamingesamtmenge, Menge der Fraktionen, einzeln und nebeneinander, Ausscheidung, die Bindung des Vitamin an Enzyme und die katalysierten Reaktionen. Mit den Methoden der Ultraviolett-, Infrarot-, Massen- und Kernresonanzspektroskopie lassen sich Strukturanalysen und Bestimmungen durchführen. Zur klinischen Bestimmung von Vitamin B_6 -Aktivitäten und Vitamin B_6 -Antagonisten bedient man sich des tierischen Organismus.

3.1.2. In der Einleitung wurde zum ersten Mal in der Literatur der Vitamin B_6 -Bestimmung auf die bewußte Trennung von Vorbestimmungsmethode und der eigentlichen Bestimmungsmethode hingewiesen. Die Vitamin B_6 -Bestimmungsmethoden sollen qualitativ wie quantitativ spezifische Nachweismethoden dieser Vitamingruppe sein.

3.1.3. Mit dieser Definition sollen die Bestimmungsmethoden von den Methoden der Vorbestimmung abgegrenzt werden. Die

Technik der Hydrolyse machen das Vitamin aus Nahrungsmitteln und biologischem Material zugänglich, die nachgeschaltete Chromatographie trennt das Hydrolysat auf, schließt Störfaktoren weitgehend aus und erhöht damit die Spezifität des Nachweises bei jeder beliebigen Analysenprobe, oder macht die Bestimmung überhaupt erst möglich. Lediglich die Gaschromatographie ist für pharmazeutische Präparate qualitativ und quantitativ schon so spezifisch, daß sie als eigene Bestimmungsmethode in diesem Sinne gelten kann.

3.1.4. Die Einteilung der Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden erfolgt unter dem Gesichtspunkt des besonderen Charakters des Nachweises. Nach GYÖRGY (1951 a) und STORVICK und McLEOD PETERS (1964) sollen in der vorliegenden Arbeit die Bestimmungsmethoden in

- Physikalische
- Chemische
- Enzymatische
- Mikrobiologische und
- Biologische Nachweismethoden eingeteilt werden.

3.1.5. Weiter sollen physikalische und chemische Bestimmungsmethoden als eigene Themenkreise getrennt behandelt werden. Dies geschieht im Gegensatz zu STROHECKER und HENNING (1963), GSTIRNER (1965) und STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964), die die physikalischen und chemischen Methoden als physikalisch-chemische Methoden gemeinsam behandeln. Die Trennung beider Methoden ist notwendig, um das Gebiet der physikalischen und chemischen Bestimmungsmethoden nicht unübersichtlich werden zu lassen. Sie ist logisch, weil eine Reihe neuer physikalischer Nachweismethoden für die Vitamin B₆-Bestimmung beschrieben werden, die sich chemischen Methoden einfach nicht zuschreiben lassen. Eine eindeutige Trennung ist möglich, wenn man den physikalischen Methoden die Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden zuordnet, an denen das Vitamin vor der Messung chemisch verändert wird.

FRAGNER (1964/65) und KNOBLOCH (1963) beschreiben physikalische und chemische Vitamin B₆-Nachweismethoden als getrennte Verfahren, ordnen aber die Nachweise sehr vage nach dem Gesichtspunkt ein, daß "das Unterscheidungskriterium zwischen chemischer und physikalischer Bestimmung der Charakter der grundlegenden analytischen Operation der Methode ist" (FRAGNER 1964/65).

3.1.6. Die Wahl der geeigneten Methode ist von der Laborausstattung, von der Problemstellung des Nachweises und von der Frage abhängig, welchen Aufwand man bereit ist, in Kauf zu nehmen. Innerhalb der jeweiligen physikalischen, chemischen, mikrobiologischen, enzymatischen und biologischen Nachweismethoden stehen wiederum mehrere Verfahrenstechniken und ihre Modifikation zur Auswahl. Diese Verfahren können sich durch Spezifität, Schnelligkeit und Empfindlichkeit unterscheiden.

3.1.7. Im allgemeinen gestatten alle oben angeführten Nachweismethoden der Vitamin B₆-Bestimmung unter der Berücksichtigung des Grundsatzes der Vorbestimmung einen spezifischen und empfindlichen Vitamin B₆-Nachweis. Lediglich der biologische Test hat sich als genaues Vitamin B₆-Nachweisverfahren nicht bewähren können und wird von KÖRNER und NOWAK (1966 a, b) zur qualitativen Untersuchung der Vitamin B₆-Aktivität herangezogen. Manche Autoren verbinden mehrere Bestimmungsmethoden miteinander, um unterschiedliche Aufgabenstellungen lösen zu können.

3.2. Die physikalischen Bestimmungsmethoden

3.2.1. Allgemeines

3.2.1.1. Die physikalischen Vitamin-Bestimmungsmethoden beruhen auf der Verwertung charakteristischer, physikalischer Konstanten des Vitamins (KNOBLOCH 1963). Diese sind: Absorption und Emission des Vitamin B₆ im Ultraviolettlicht, charakteristisches Verhalten im Infrarot-Spektrum, bei der Polarographie, im Massenspektrum und bei der Kernresonanzspektroskopie.

3.2.1.2. Auch die chemischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden werden durch Messungen im sichtbaren Licht und im ultravioletten Licht objektiviert. Im Gegensatz zu den physikalischen Bestimmungsmethoden wird das Vitamin B₆ hier aber durch eine chemische Reaktion verändert.

3.2.1.3. Folgende physikalischen Nachweismethoden können zur Vitamin B₆-Bestimmung herangezogen werden

- Direkte spektrophotometrische Bestimmung
- Direkte fluorometrische Bestimmung
- Polarographische Bestimmung
- Kernresonanzspektroskopie
- Massenspektroskopie
- Infrarotspektroskopie
- Isotopenmethode

3.2.2. Direkte spektrophotometrische Bestimmung

3.2.2.1. Die Methoden der direkten spektrophotometrischen Messung der Vitamin B₆-Komponenten beruhen auf ihrem charakteristischen Absorptionsspektrum im Ultraviolettlicht. Nachweismethoden des Vitamin B₆ mit Hilfe der direkten Spektrophotometrie werden von MELNICK, HOCHBERG, HIMES und OSER (1945), PETERSON und SOBER (1954), SHAH, RAMAN und MEHTA (1965) und WEBER, URBIGKEIT und SENKOWSKI (1968) beschrieben. An Hand des spektrophotometrischen Verhaltens verschiedener Vitamin B₆-Derivate analysieren JOHNSON und METZLER (1970) die Strukturen von Vitamin B₆.

3.2.2.1.1. Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum von Vitamin B₆ ist charakteristisch. Der pH-Wert und das jeweils vorliegende Vitamin B₆-Derivat bestimmen die Lage der Maxima und der Minima. MELNICK, HOCHBERG, HIMES und OSER (1945) untersuchten die Absorptionsspektren von POL, PAL und PAM für die pH-Werte: 2,1, 6,75 und 10,2. Aus Tabelle 15 geht hervor, daß POL, PAL und PAM im sauren Bereich ein einziges Absorptionsmaximum haben. Im weniger sauren bis basischem Bereich (pH 6,75 und pH 10,2) zeigen POL, PAL und PAM unter dem Ultraviolettlicht zwei Absorptionsmaxima.

Tabelle 15: Lage der Absorptionsmaxima von POL, PAL und PAM für die pH-Werte 2,1, 6,75 und 10,2 nach MELNICK, HOCHBERG, HIMES und OSER (1945).

pH-Werte	Absorptionsmaxima (in nm) der Vitamin B ₆ -Derivate		
	POL	PAL	PAM
2,1	288	286	292
6,75	254 u. 325	251 u. 316	250 u. 325
10,2	246 u. 311	237 u. 301	246 u. 311

STROHECKER und HENNING (1963) untersuchen die Absorptionsmaxima von POL für die pH-Werte 2, 5, 7 und 10. Der Verlauf dieser Absorptionskurven ist in Figur 5 wiedergegeben.

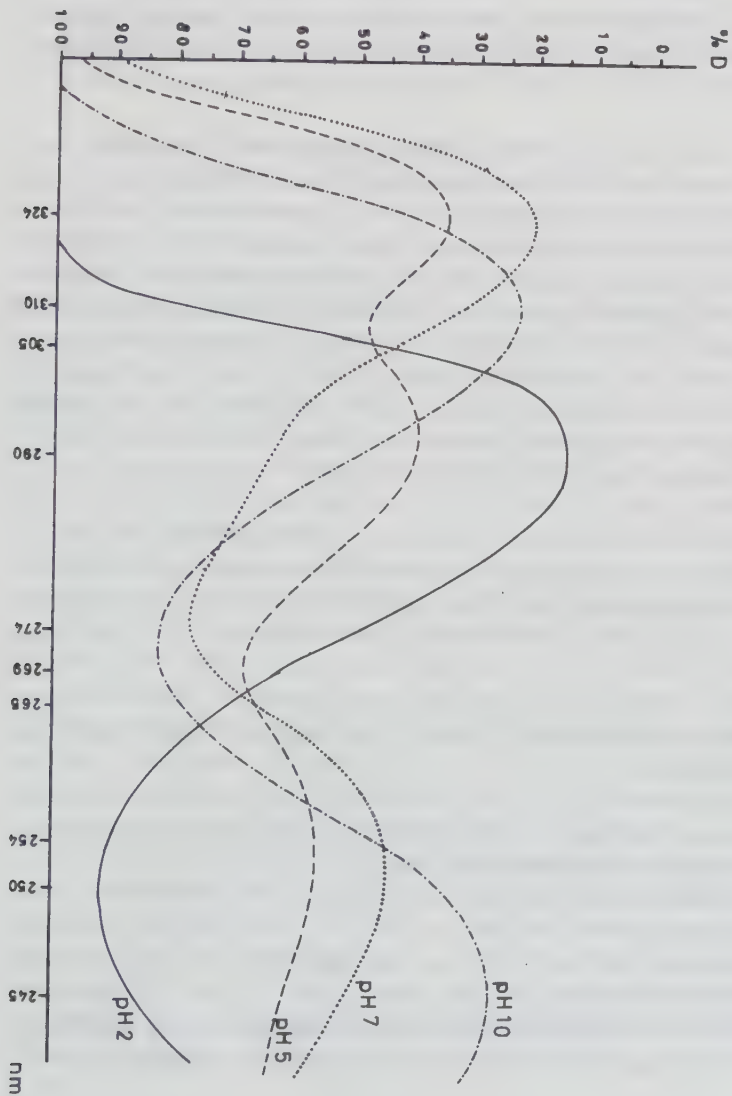
PETERSON und SOBER (1954) beschreiben die Absorptionsspektren von POLP, PALP und PAMP im sauren, basischen und neutralen Medium. Sie fanden ihre Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Autoren. Die Spezifität des Ultraviolett-Absorptionsspektrum erlaubt die qualitative Bestimmung von Vitamin B₆-Derivaten.

3.2.2.1.2. Die quantitative Messung erfolgt bei der Ultraviolett-Spektroskopie durch die Messung der Lichtabsorption durch die Lösung in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Es gelten die Gesetze der Lichtabsorption: die Extinktion ist von der Konzentration einer Lösung linear abhängig. Aus der gemessenen Extinktion, am besten bei der Wellenlänge, für welche ein Absorptionsmaximum vorliegt, läßt sich die Menge des absorbierenden Stoffes errechnen. Die erhaltenen Werte der Absorption lassen sich teilweise erst nach Umrechnung vergleichen, weil sie als molare Extinktion (EM) und als spezifische Extinktion ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) angegeben werden.

3.2.2.2. Probleme der Photometrie

3.2.2.2.1. Die Vitamine der B₆-Gruppe sind photosensibel, d.h. sie werden durch Licht zerstört. Diese Eigenschaft muß bei allen spektrophotometrischen und fluorometrischen Nachweisverfahren beachtet werden. Pyridoxal-5-phosphat wird unter der

Figur 5: Verlauf der Absorptionskurven von POL für die pH-Werte 2, 5, 7 und 10 nach STROHECKER und HENNING (1963)



Ultraviolett-Lampe innerhalb von 5 Minuten zu 95 % zerstört. CHEN (1965) weist nach, daß Pyridoxamin-5-phosphat bei pH 7 und einer Beleuchtung von 326 nm innerhalb von 100 Sekunden zu 50 % zerstört wird. SHAH, RAMAN und MEHTA (1965) kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Um Pyridoxin für die spektrophotometrische Messung zu stabilisieren, verwenden diese Autoren eine Pufferlösung, die 1 % Glyzerin enthält.

3.2.2.2. Die Vitamin B₆-Derivate zeichnen sich jedes für sich durch ein pH-abhängiges, spezifisches Ultraviolett-Spektrum aus. Unter gleichen Bedingungen gemessen unterscheiden sich die Peaks ihrer Spektren durch die Lage und Größe der Absorptionsmaxima. Bei der gleichzeitigen Bestimmung von Vitamin B₆-Derivaten nebeneinander, müssen besondere Methoden entwickelt werden, um diese Eigenschaft auszugleichen. MELNICK, HOCHBERG, HIMES und OSER (1945) bestimmen POL, PAL und PAM bei pH 6,75 und 325 nm gemeinsam, weil alle Substanzen für diese Wellenlänge und diesen pH-Wert eine spezifische Extinktion von $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 440$ besitzen.

3.2.2.2.3. Mögliche Störfaktoren, irrelevant absorbierende Stoffe, wie z.B. andere Vitamine der B-Gruppe müssen durch chromatographische Methoden sorgfältig entfernt oder vor der Bestimmung genau in Rechnung gestellt werden.

3.2.2.3. Spektrophotometrische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Vitamin B₆ werden für folgende Aufgabenbereiche beschrieben:

- getrennte Bestimmung von POL und PAL in Reinstpräparaten
- Gesamtbestimmung von POL, PAL und PAM in Hydrolyseprodukten und pharmazeutischen Präparaten
- Gesamtbestimmung von PAL und PAM in pharmazeutischen Präparaten
- Bestimmung von PALP in einer pharmazeutischen Mischung von PAL und PALP
- differentialphotometrische Bestimmung von POL in Multivitaminpräparaten. Diese Methode wird von WEBER, URBIGKEIT

und SENKOWSKI (1968) zu einer automatisierten Pyridoxinbestimmungsmethode in Multivitamin-tabletten ausgewertet.
-Bestimmung von Pyridoxin und Riboflavin (nach CAPEK und KNOBLOCH 1963).

Die nachfolgende Tabelle 16 gibt eine Übersicht über bewährte spektrophotometrische Vitamin B₆-Bestimmungen und ihren Besonderheiten an.

3.2.3. Direkte fluorometrische Bestimmung

3.2.3.1. Fluoreszenz als Vitamin B₆-Bestimmungsmethode

3.2.3.1.1. Fluoreszenz ist die Fähigkeit bestimmter Substanzen Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und auf einer anderen Wellenlänge abzustrahlen. Diese Eigenschaften macht sich die Fluorometrie zunutze; sie ist seit langem, Dank ihrer hohen Empfindlichkeit, eine bevorzugte Analysenmethode.

3.2.3.1.2. Die außerordentliche Empfindlichkeit gibt ihr einen Vorteil über andere physikalische und chemische Methoden, aber die instrumentellen Grenzen hatten lange Zeit ihre Anwendung auf eine kleine Materialgruppe beschränkt (DUGGAN, BOWMAN, BRODIE und UDENFRIEND 1957). Die Entwicklung neuer Geräte, z.B. des Aminco-Bowman-Spektrofluorometers, Ferrand-Spektrofluorometer und die besonderen Mikrofluorometer erweitern die Anwendungsbreite der Fluorometrie als Identifizierungs- und Analysenmethode erheblich. Nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) können Konzentrationen von $0,5 \times 10^{-10}$ und weniger mit einem hohen Maß an Genauigkeit gemessen werden. Die Empfindlichkeit ist damit 10 bis 100 mal größer, als die Empfindlichkeit bei den sogenannten kolorimetrischen Methoden.

3.2.3.1.3. Entsprechend der Spektrophotometrie läßt sich auch die Fluorometrie des Vitamin B₆ sowohl in eine direkte als auch in eine indirekte Methode mit dem Unterscheidungskriterium einteilen, ob die Messung am unveränderten Vitamin B₆-Derivat vorgenommen, oder ob das Vitamin vor der Messung chemisch verwandelt wird. Die indirekte Spektrofluorometrie umfaßt eine eigene Gruppe von Nachweismethoden und wird bei den chemischen

Tabelle 16: Bewährte Methoden der direkten spektrophotometrischen Vitamin B₆-Bestimmung

Autor	Vitamin B ₆	Messungsbedingungen		Extinktion E _{1cm} ^{1%}
		pH-Wert	Frequenz	
STROHECKER, HENNING (1963)	POL	2,0	290,5 nm	430
	PAL	2,0	296,5 nm	440
Bemerkung: Diese Methode eignet sich besonders zur Routine- untersuchung von Vitamin B ₆ in Ampullenlösungen und Tabletten.				
MEINICK, HOCHBERG, HIMES, OSER (1945)	POL			
	PAL	6,75	325 nm	440
	PAM			
Bemerkung: Diese Methode eignet sich zur Gesamtbestimmung von POL, PAL und PAM, da diese Substanzen unter den Versuchsbe- dingungen die gleiche Extinktion von E _{1cm} ^{1%} =440 besitzen.				
METZLER, SNEEL (1952)	PAL	6,7	323,5 nm	440
	PAM			

Bemerkung: Die Autoren verwenden diese Methode zur gemeinsamen Bestimmung von PAL und PAM.

Autor	Vitamin B ₆	Messungsbedingungen pH-Wert	Frequenz	Extinktion	
PETERSON, SOBER (1954)	PALP + PAL PAL	7,0 7,5	388 nm 388 nm	EM = 4900 EM = 200	Bemerkung: Die Methode eignet sich zur Bestimmung von PALP in einem Gemisch von PALP und PAL. Die molare Extinktion von PAL (EM = 200 bei pH 7,5) kann gegenüber der molaren Extinktion von PALP und PAL (EM = 4900 bei pH 7,0) vernachlässigt werden.
SHAH, RAMAN, SHAH (1963)	POL POL	7,0 1,12	328 nm 328 nm	Absorbanz keine Absorbanz	Bemerkung: Differentialspektrophotometrische Bestimmungsmethode von Vitamin B ₆ ; POL wird bei pH 7 und pH 1,12 bei 328 nm gemessen.
CAPEK, KNOBLOCH (1963)	POL + Ribo- flavin	7,0	324 nm	E _{1cm} ^{1%} = 360	Bemerkung: Diese Methode eignet sich zur Bestimmung von POL in Gegenwart von Riboflavin. Nach der Bestimmung von Riboflavin im sichtbaren Bereich, wird die quantitative Bestimmung von Riboflavin und POL bei 324 nm durchgeführt. Aus der Differenz beider Extinktionen erhält man die gesuchte Menge des Vitamin B ₆ .

Nachweismethoden besprochen.

3.2.3.2. Das fluorometrische Verhalten von Vitamin B₆-Derivaten wurde von DUGGAN, BOWMAN, BRODIE und UDENFRIEND (1957), COURSIN und BROWN (1958), TOEPFER und LEHMANN (1961), CHURCHICH (1964), WAMPLER und CHURCHICH (1969) und CHEN (1965) im Hinblick auf seine Brauchbarkeit als Analyseverfahren untersucht.

3.2.3.2.1. Das Fluoreszenzspektrum ist gekennzeichnet durch die Lage und Intensität der Fluoreszenzmaxima. Die Lage des Spektrum ist eine Funktion des Ionenzustandes der Substanz, und ist damit abhängig vom pH-Wert der verwendeten Lösung und von der Art des Vitamin B₆-Derivates.

Die Intensität des Fluoreszenzspektrum ist von der Konzentration der fluoreszierenden Substanz, der Intensität der verwendeten Strahlungsquelle und ihrer Aktivierungsfrequenz und der Temperatur abhängig.

3.2.3.2.2. Entsprechend diesen Parametern gilt es im Ultraviolett-Bereich eine Aktivierungsfrequenz zu finden, für welche das gegebene Vitamin B₆-Derivat eine optimale Fluoreszenz liefert. In neuesten Arbeiten (CHEN 1965, CHURCHICH 1965, WAMPLER und CHURCHICH 1969) werden Spektren auf das sogenannte "absolute quantum-yield" hin untersucht. Diesen quantum-yield kann man als den absoluten Fluoreszenzwirkungsgrad übersetzen. Es ist der Quotient aus den aufgenommenen und abgestrahlten Photonen. Das Prinzip der quantitativen Auswertung beruht auf dem Vergleich der Intensität einer Standardlösung mit der Fluoreszenzintensität der zu messenden Lösung. Die Tabelle 17 zeigt das fluorometrische Spektrum von Vitamin B₆-Derivaten. Sie enthält Werte des absoluten quantum-yield und die Nachweisgrenze, soweit sie die Autoren angegeben haben.

3.2.3.3. Störfaktoren der Fluoreszenzmessung sind "falsche Fluoreszenzen", die durch Verunreinigungen entstehen können.

Tabelle 17: Bewährte Methoden der direkten fluorometrischen Vitamin B₆-Bestimmung

Autor	Vitamin B ₆	Versuchsbedingungen		Fluoreszenz- maximum	Nachweisgrenze
		pH-Wert	Aktivierungs- frequenz		
DUGGAN, BOWMAN,	POL	7	340 nm	400 nm	0,0015/µg/ml
BRODIE, UDENFRIEND	PAL	7	330 nm	385 nm	0,002/µg/ml
(1957)	PAM	7	335 nm	400 nm	0,001/µg/ml
STORVICK, BENSON,	POL	7	325 nm	400 nm	
EDWARDS, WOODRING	PAL	7	320 nm	385 nm	
(1964)	PAM	7	325 nm	405 nm	
	PALP	7	330 nm	375 nm	
	PAMP	7	330 nm	400 nm	
	PXS	3,4	325 nm	425 nm	
COURBIN, BROWN	POL	6,75	340 nm	400 nm	
(1958)	PAL	6,75	330 nm	385 nm	
	PAM	6,75	335 nm	400 nm	

Autor	Vitamin B ₆	Versuchsbedingungen			Fluoreszenz- maximum	Quantum Yield
		pH-Wert	Aktivierungs- frequenz			
WAMPLER, CHURCHICH (1969)	PAL	1	288 nm	378 nm	0,08	
		7	317 nm	378 nm	0,08	
		9	302 nm	360 nm		
Äthanol - Wasser (95:5)		9	290 nm	320 nm	0,40	
Glycerin - Phosphorsäure (50:50)		7	317 nm	378 nm	0,10	
Glycerin - Phosphorsäure (70:30)		7	317 nm	378 nm	0,10	
Glycerin - Phosphorsäure (90:10)		7	317 nm	378 nm	0,12	
Mac ARTHUR, LEHMANN (1959)	POL	5,5-7,0	320 nm	395 nm		
	PAL	5,5-7,0	325 nm	385 nm		
	PAM	6,0	330 nm	395 nm		
	PXS	3,5	323 nm	422 nm		
CHURCHICH (1965)	PAMP	< 1	295 nm	333 nm		
		2	292 nm	392 nm		
		8,2	310 nm	370 nm		
		10,1	327 nm	392 nm		

Aber auch die Fluoreszenzmaxima der Vitamin B₆-Derivate interferieren teilweise miteinander. Ein weiteres Problem der Fluorometrie ist die Unbeständigkeit des Vitamin B₆ im Ultraviolettlicht. Dieses Problem ist im Zusammenhang mit der Spektrofluorometrie bereits erläutert worden. Ohne chromatographische Vorbestimmung ist die Indikation der Fluoreszenzmessung für Vitamin B₆ auf den Nachweis geringster Spuren in Reinstpräparaten beschränkt. Der Nachweis in Reinstpräparaten kann nach den in der Tabelle 17 aufgezeichneten Verfahren durchgeführt werden. Vitamin B₆-Analyseproben aus beliebigem Material müssen dagegen vorgereinigt und die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden, bevor der spezielle Nachweis erfolgen kann.

3.2.3.4. Sichere fluorometrische Nachweise der einzelnen Vitamin B₆-Derivate gelingen nach allen in der Tabelle aufgezeichneten Verfahren. Das Verfahren nach DUGGAN, BOWMAN, BRODIE und UDENFRIEND (1957) ist deshalb hervorzuheben, weil es als gesicherte Nachweismethode bei geringster Konzentration angesehen werden kann. Mit dem fluorometrischen Nachweis verschiedener Vitamin B₆-Derivate nebeneinander beschäftigen sich FASELLA, TURANO und GIARTOSIO (1959), COURSIN und BROWN (1958).

3.2.3.4.1. FASELLA, TURANO und GIARTOSIO (1959) gelingt die gleichzeitige fluorometrische Bestimmung von PALP und PAMP: zur Bestimmung von PAMP wird die Lösung bei pH 7 und 330 nm aktiviert, und die Fluoreszenz bei 390 nm gemessen. Die Fluoreszenz von PALP ist unter diesen Bedingungen bei 390 nm so gering, daß sie vernachlässigbar ist. Zur Bestimmung von PALP wird die Analysenprobe in einer Äthanol-1,0 n NaOH-Lösung (80:20) bei 410 nm aktiviert. Die Fluoreszenz wird bei 525 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge zeigt PAMP keine Fluoreszenzen mehr.

3.2.3.4.2. Einen getrennten Nachweis von POL, PAL und PAM im Bluthydrolysat beschreiben COURSIN und BROWN (1958). Sie be-

stimmen dreimal hintereinander den Vitamin B₆-Gehalt ihrer Analyselösung bei pH 6,75, einer Aktivierungswellenlänge von 335 nm und der Messung der Fluoreszenzen bei 400 nm. Bei der ersten Messung wird der Vitamin B₆-Gesamtgehalt bestimmt. Vor der zweiten Messung wird durch 30 %iges H₂O₂ Pyridoxal zerstört. Bei der zweiten Messung werden POL und PAM bestimmt. In der dritten Messung wird nur noch POL bestimmt, nachdem PAM durch eine 5 Minuten andauernde ultraviolette Bestrahlung zerstört worden ist. Aus den Differenzen der drei Messungen lassen sich die einzelnen Vitamin B₆-Fraktionen errechnen. Inwieweit diese Nachweismethode brauchbar ist, kann hier nicht diskutiert werden. Immerhin wäre es denkbar, daß durch die Gabe von 30 % H₂O₂ nicht nur PAL, sondern auch POL und PAM teilweise zerstört würden. Auf die Photosensibilität der Vitamin B₆-Derivate ist u.a. durch SHAH, RAMAN und MEHTA (1965) und CHEN (1965) hingewiesen worden. Aus diesem Grunde ist es kaum denkbar, daß man eine Vitamin B₆-Lösung 5 Minuten unter dem Ultraviolettlicht bestrahlen kann, ohne POL mit zu zerstören. Im allgemeinen stellt die Methode der direkten Fluorometrie dank ihrer Empfindlichkeit und Schnelligkeit eine hervorragende Nachweismethode bei der Vitamin B₆-Bestimmung dar. Diese Nachweismethoden lassen sich für alle Vitamin B₆-Derivate in geringsten Mengen und beliebigen Analysenproben durchführen, wenn die Grundsätze der Vorbestimmungsmethoden beachtet werden.

3.2.3.5. Phosphorimetrische Eigenschaft des Vitamin B₆

Von den Eigenschaften der Fluoreszenz des Vitamin B₆ sind die Eigenschaften der Phosphoreszenz zu unterscheiden. Hält die Erscheinung des Nachleuchtens einer Substanz nach Abschalten der Erregerquelle an, so spricht man von Phosphoreszenz. Die Fluoreszenzdauer des Pyridoxin beträgt ca. 10^{-8} Sekunden, die Phosphoreszenzdauer von Vitamin B₆-Derivaten beträgt dagegen 1,1 bis 4 Sekunden. CHURCHICH (1964) und WAMPLER und CHURCHICH (1969) untersuchen die Phosphoreszenzeigenschaften des PALP und PAL, ohne jedoch Nachweisverfahren daran zu knüpfen. Es wird wahrscheinlich nur eine Frage der Zeit sein, bis Nach-

weismethoden für Pyridoxinderivate auf dieser Grundlage entwickelt sein werden.

3.2.3.5.1. Vom Aufbau her ähneln sich die Versuchsanordnungen der Phosphoreszenzmessung, der spektrophotometrischen Messung und der fluorometrischen Untersuchungen. Die Parameter sind:

-pH-Wert

-Lösungsmittel

-Erregerfrequenz und

-Temperatur, bei der die Messung durchgeführt wird. Die nachleuchtenden Eigenschaften sind durch Frequenz und Dauer der Phosphoreszenz charakterisiert.

3.2.3.5.2. Der "phosphorescence-quantum-yield" des Pyridoxol liegt nach einer Messung von WAMPLER und CHURCHICH (1969) bei 0,43. Dieser hohe Wirkungsgrad ließe quantitative Messungen mit einer hohen Nachweisgrenze erwarten. Vergleicht man diesen Wert mit dem "quantum-yield" der fluorometrischen Messung (ca. 0,08), so kann man annehmen, daß eine sehr hohe Nachweisgrenze zu erwarten wäre.

3.2.3.6. Die Vorteile der spektralen Bestimmung des Vitamin B₆ unter dem Ultraviolettlicht sind augenfällig. Leider bereitet die Bestimmung der Vitamin B₆-Derivate ohne vorherige Auftrennung und Reinigung durch chromatographische Verfahren Schwierigkeiten. Gelänge es von einer Analysenprobe sowohl die spektrophotometrischen, fluorometrischen, als auch phosphorimetrischen Eigenschaften zum gleichen Zeitpunkt zu erfassen, hätte man ein Bestimmungsverfahren von großer quantitativer und qualitativer Spezifität in der Hand.

3.2.4. Polarographische Bestimmung

Nach KNOBLOCH (1963) ist die Polarographie eine elektrochemische Analysemethode, bei der aus der Gestalt der Stromspannungskurve auf die Art und die Menge bestimmter Bestandteile einer Lösung geschlossen werden kann. Um unter exakt definierten Bedingungen arbeiten zu können, hat erstmals HEYROVSKY (1960) die

"tropfende Quecksilberelektrode" eingeführt. Er eröffnete damit die Entwicklung eines neuen Gebietes der Elektrochemie, der Polarographie.

3.2.4.1. Der Aufbau eines Polarographen ist im Prinzip einfach; aus einer Glaskapillare tropft Quecksilber in ein Becherglas und sammelt sich am Gefäßboden an. Zwischen dem Quecksilber in der Kapillare und am Gefäßboden wird eine Gleichspannung angelegt. Diese ist über einen Potentiometer regelbar. In das Becherglas wird das zur Untersuchung stehende Substrat als Lösung eingefüllt. Zur Messung der Stromstärke werden ein empfindliches Galvanometer oder sonstige Meßinstrumente zwischen geschaltet. Diese registrieren die Intensitätsentspannungskurven. Zur ausführlichen Beschreibung von Aufbau, Versuchsanordnung und Arbeitsweise der polarographischen Apparatur sei auf KNOBLOCH (1963) und HEYROVSKY (1960) verwiesen.

3.2.4.2. Für den Stromkreis im Polarographen gilt das Ohm'sche Gesetz. Da aber die Lösung im Becherglas ein Elektrolyt ist, tritt an den Hg-Elektroden die Erscheinung der Polarisierung auf. Sie ist der angelegten Spannung entgegengerichtet. Solange die angelegte Spannung der Polarisierungsspannung gleich ist, geht kein Strom hindurch. Bei wachsend angelegter Spannung, die größer sein muß, als die Polarisierungsspannung, steigt der Strom bis zu dem Wert an, bei welchem die reduzierbare Substanz in der nächsten Umgebung der Elektrode pro Zeiteinheit erschöpft ist. Weitere reduzierbare Substanzen werden durch den Vorgang der Diffusion an die Elektrodenoberfläche herangebracht. Da dieser Transport den Diffusionsgesetzen gehorcht, tritt in der Kurve eine obere Stromgrenze, oder der "sogenannte Grenzstrom" auf. Der Diffusionsstrom ist der Strom, der nach Erreichen der oberen Stromgrenze fließt. Für die Größe des Diffusionsstromes gilt nach KNOBLOCH (1963) folgende Beziehung:

$$i = k \cdot c$$

i ... Grenzstrom

k ... Proportionalitätskonstante

$$k = 0,63 \cdot 10^{-3} \cdot F \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6}$$

F ... Faraday'sche Konstante (96498 Coulomb)

n ... Anzahl der für die Reduktion des Polarisators erforderliche Ladung

D ... Diffusionskoeffizient des in einem gegebenen Milieu reduzierten Teilchen

m ... Hg-Menge (g/sec) die durch die Kapillare tropft

t ... Tropfdauer in Sekunden

0,63 ... Zahlenfaktor der durch Vereinigung der geometrischen Faktoren erhalten wird

c ... Konzentration, der in Lösung reduzierten Substanz

Die Analysenprobe wird nach folgenden Meßkriterien untersucht:

-Diffusionsstrom: die Stufenhöhe des Polarogramms entspricht dem Diffusionsstrom. Die Konzentration einer beliebigen reduzierbaren Substanz ist dem Diffusionsstrom proportional

-Halbstufenpotential: es ist das Potential an der Stelle der polarographischen Kurve, für welche die Bedingung

$I = 1/2 \cdot I$ (Diffusion) gilt. Dieses Halbstufenpotential entspricht dem normalen Redoxpotential.

3.2.4.3. Zur Beurteilung der polarographischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden zitieren GSTIRNER (1965), KNOBLOCH (1963), STROHECKER und HENNING (1963), STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) die Arbeiten von LINGANE und DAVIS (1941), MANOUSEK und ZUMAN (1960 und MANOUSEK und KOCOVA (1961). Man darf deshalb mit großer Sicherheit annehmen, daß die polarographischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden keine vielpraktizierten und weit verbreiteten Methoden sind. Das ist umso erstaunlicher, als sich mit einfachsten polarographischen Apparaturen quantitative Bestimmungen mit einer hohen Empfindlichkeit und einer großen Genauigkeit von $\pm 2-3\%$ durchführen lassen. Mikroapparaturen sind darüberhinaus entwickelt worden, in welchen noch Flüssigkeitsmengen bis 0,005 ml untersucht werden können (HEYROVSKY 1960).

3.2.4.3.1. LINGANE und DAVIS (1941) beschreiben die polarographische Bestimmungsmethode einer POL-Lösung in Tetramethylammoniumbromid. Diese Methode eignet sich nach FRAGNER (1964/65) nur zur Bestimmung reiner Pyridoxollösungen. Als Analyse-methode für pharmazeutische Präparate ist sie nicht brauchbar, da andere Vitamine der B-Gruppe dabei stören.

3.2.4.3.2. MANOUSEK und KOCOVA (1961) beschreiben zwei mögliche polarographische Bestimmungsmethoden von POL in Injektionslösungen und Tabletten. Diese Methoden beruhen a) auf der polarographischen Reduktion des Pyridoxol im $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer und b) auf der Bildung einer katalytischen Stufe des Pyridoxols im Veronalpuffer:

-Im ersten Fall werden 0,5 ml Analysenlösung mit 0,5 ml 0,2 m $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer (pH 8,7) in das polarographische Gefäß pipettiert und in 2-elektronischer Stufe reduziert. Die Höhe dieser Stufe wird mit der Höhe einer Standard-Pyridoxol-lösung verglichen.

-Im zweiten Fall werden 0,5 ml Analysenlösung mit 0,5 ml, 0,1 m Veronalpuffer (pH 8,3) in das polarographische Gefäß pipettiert. Nach Durchgasen der Lösung mit Stickstoff werden die katalytischen Stufen registriert und deren Höhe mit der Höhe einer Standard-Pyridoxollösung verglichen. Da die Grenzströme in diesem System praktisch doppelt so groß sind wie im ersten System wird mit geringerer Galvanometerempfindlichkeit gearbeitet.

Weiter geben die Autoren an, daß die Anwesenheit von Nikotinsäure und andere Begleitstoffe in den Präparaten die Pyridoxolbestimmung stören. Die beschriebenen Methoden machen es möglich, POL in Konzentrationen von $1-9 \times 10^{-4} \text{ m}$ zu analysieren. Die Genauigkeit der Messungen, die bei der verwendeten Versuchsanordnung 2-3 % beträgt, kann durch das Prinzip der sogenannten "Ableitungsschaltung" noch verbessert werden.

3.2.4.3.3. MANOUSEK und ZUMAN (1960) und MANOUSEK (1959) arbeiteten zwei polarographische Verfahren zur Bestimmung von PAL und PALP nebeneinander aus. Das Prinzip der ersten Methode ist es, die Reduktionsstufen bei pH 2 und 9 zu messen. Bei pH 2 zeigt PAL eine so geringe Reduktionsstufe, daß sie gegen die Reduktionsstufe von PALP zu vernachlässigen ist; so kann praktisch nur die Menge von PALP gemessen werden. Bei pH 9 haben PAL und PALP gleich große Reduktionsstufen, so daß die Gesamtmenge von PAL und PALP bestimmt wird. Die Differenz zwischen der ersten und der zweiten Messung entspricht der Menge

von PAL. Bei der zweiten Methode geht die Reaktion von PAL und PALP mit Hydroxylamin der polarographischen Bestimmung voraus. Damit ist diese zweite Methode keine physikalische Nachweismethode im Sinne der Einleitung mehr. Sie soll aber trotzdem mit den physikalischen Methoden besprochen werden, um den Zusammenhang nicht zu stören. Die Kondensation von PAL und PALP mit Hydroxylamin verläuft in schwach saurem und schwach alkalischem Milieu rasch und quantitativ. Die Halbstufenpotentiale dieser Oximstufen unterscheiden sich im Veronalpuffer von pH 9 um ca. 80 mV. Diese Differenz genügt zur Messung. Mit dieser Methode sind 3×10^{-5} m Pyridoxal selbst neben der 50-fachen Menge PALP bestimmbar. Die Gegenwart von POL und PAM stören die Messungen nicht. (MANOUSEK und ZUMAN 1960)

3.2.5. Kernresonanzspektroskopische Bestimmungsmethode

3.2.5.1. Modernste, physikalische Analyseverfahren, die Kernresonanzspektroskopie, die Massenspektroskopie und die Infrarotspektroskopie waren noch vor wenigen Jahren in der Literatur der Vitamin B₆-Bestimmungen unbekannt. Bei FRAGNER (1964/65), KNOBLOCH (1963) und STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) fanden sie nicht einmal als mögliche Nachweismethoden Erwähnung. Das ist verständlich, da sie als junge Spezialverfahren der physikalischen Chemie hauptsächlich zur Klärung tautomerer Gleichgewichte, Bindungszustände, Elektronendichte, Komplexbildung und Massengewichte eingesetzt werden. Die spezielle Aufgabenstellung dieser Analysemethoden muß uns von der Vorstellung eines ausschließlich auf qualitativen und quantitativen Nachweisverfahren fort- und hin zu der Vorstellung von Verfahrensmethoden der Strukturanalyse von Vitamin B₆ führen. Als solche Verfahren müssen Massenspektroskopie, Kernresonanzspektroskopie und Infrarotspektroskopie verstanden werden; als solche können sie bei der Vitamin B₆-Forschung eingesetzt werden.

3.2.5.2. "Die Kernresonanzspektroskopie, hoher Auflösungsstärken wird heute als eines der empfindlichsten und allgemein anwendbaren physikalisch-chemischen Techniken bei der Unter-

suchung organischer Moleküle angesehen" (KORYTNYK und AHRENS 1970). 1963 wurde durch KORYTNYK und SINGH zum ersten Mal ein Kernresonanzspektrum der Vitamin B₆-Gruppe aufgestellt. Ziel dieser Untersuchung war es noch, den Wert der Kernresonanzspektroskopie als Mittel der Strukturanalyse synthetischer Vitamin B₆-Derivate zu untersuchen. Inzwischen findet die Kernresonanzspektroskopie in zunehmendem Maße in der Vitamin B₆-Forschung mit großem Erfolg Anwendung (KORYTNYK und AHRENS 1970). Sie wird zur Klärung der Strukturen der Vitamin B₆-Analoge, -Metaboliten, -Derivate und zur Klärung des Säure-Base-Gleichgewichtes von PAM und PAL eingesetzt.

3.2.5.2.1. Die Kernresonanzspektroskopie untersucht die Resonanzen der Wasserstoff- und Deuteriumatome im magnetischen Feld. Sie wird in den beiden vorliegenden Originalarbeiten, KORYTNYK und SINGH (1963) und KORYTNYK und AHRENS (1970), mit dem Varian A-60 bei 60 Hertz durchgeführt. Das Gerät wird nach "Standardtechnik" geeicht, die Genauigkeit liegt bei 0,5 Schwingungen/sec.

3.2.5.2.2. Schweres Wasser ist das Lösungsmittel der Wahl, da Vitamin B₆-Derivate sehr gut wasserlöslich sind. Der pH-Wert wird nach Standardmethoden bestimmt. Den gewünschten pD-Wert erhält man nach KORYTNYK und AHRENS (1970), indem man 0,40 zum pH-Wert dazurechnet. Saure Lösungen erhalten KORYTNYK und SINGH (1963) und KORYTNYK und AHRENS (1970) dadurch, daß sie Chloride von Vitamin B₆ in D₂O, oder die Basen in 1 n ND₂SO₄ auflösen; basische Lösungen erhalten sie durch die Verwendung von NaOD, neutrale Lösungen (pD 7) erhalten sie durch Neutralisierung einer sauren Lösung mit 1 n NaOD.

3.2.5.3. Die Spektren der protomagnetischen Resonanz von Vitamin B₆ sind durch scharf begrenzte "Peaks" gekennzeichnet, die einer definierten Frequenz zugeordnet sind. Jeder Peak entspricht dem Resonanzfall eines Proton. Die Summe aller Peaks charakterisieren die untersuchte Substanz. Daraus folgt, daß

zwei Substanzen chemisch gleich sind, wenn ihre Kernresonanzspektren unter gleichen Bedingungen erhalten, gleich sind.

3.2.5.3.1. Das Spektrum von POL, PAL, PAM, PALP und PAMP ist durch vier Resonanzen gekennzeichnet. Es sind die Resonanzfälle der Protonen in 2-, 4-, 5- und 6-Stellung des Pyridinrings. Diese Resonanzen sind charakteristisch über das Frequenzband verteilt. Die Tabelle 18 nach KORYTNYK und SINGH (1963) zeigt die Stellung der Protonenresonanzen von POL, PAL, PAM, PALP und PAMP an.

3.2.6. Massenspektroskopische Bestimmungsmethode

Eine zweite Methode der Strukturanalyse ist die Massenspektrometrie. Massenspektrometrische Untersuchungen des Vitamin B₆ werden von DeJONGH, PERRICONE und KORYTNYK (1966) und von DeJONGH und KORYTNYK (1970) beschrieben; HÜTTENRAUCH und TÜMMLER (1967) beschreiben die Elektronenanlagerungs-Massenspektrometrie von Polymeren des Pyridoxol.

3.2.6.1. Die zu untersuchende Substanz wird im Massenspektrometer in die Gasphase gebracht und als Kation ionisiert. Die gebildeten Ionen werden entsprechend ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/e) aufgetrennt und in sogenannten Masse-Peaks registriert. DeJONGH, PERRICONE und KORYTNYK (1966) und DeJONGH und KORYTNYK (1970) verwenden dazu ein Atlas CH₄ Massenspektrophotometer. Dieses arbeitet bei einer Spannung von 70 eV und einem Arbeitsstrom von 18 μ A. Die Analysenprobe liegt mit einem Gasdruck von ca. 10^{-5} mm vor. HÜTTENRAUCH und TÜMMLER (1967) bevorzugen die Elektronenanlagerungsmassenspektrographie (EA-Massenspektrographie), weil sie es gestattet Verbindungen mit relativ hohem Molekulargewicht ohne stärkere thermische Spaltung aufzutrennen.

3.2.6.2. Das Vitamin B₆ verhält sich im Ionisierungsstrom nach dem Gesetz des Zufalls. Ein Teil der Moleküle bleibt erhalten, ein anderer Teil der Moleküle wird in alle wahrschein-

Tabelle 18: Stellung der Protonenresonanzen von POL, PAL, PAM, PALP und PAMP nach KORYTNYK und SINGH (1963)

Vitamin B ₆	2-CH ₃			4-CH ₂ OD		
	sauer	neutral	basisch	sauer	neutral	basisch
POL	-156	-143	-138	-299	-286	-286
PAL	-159	-145	-139	-402	-392	-425
PAM	-161,5		-138	-265		
PALP	-156	-144	-140,5		-624	-622
PAMP	-163	-144,5	-139	-266	-256	-282

	5-CH ₂ OD			C ₆ -H		
	sauer	neutral	basisch	sauer	neutral	basisch
POL	-286	-279	-276	-488	-456	-449
PAL	-315	-304	-289	-492	-457	-442
PAM	-291		-272,5	-494,5		-447
PALP	-303	-300	-279	-492	-463	-457
PAMP	-305	-292		-499	-456	-453

lichen Bruchstücke zerschlagen. Diese Bruchstücke können wiederum miteinander reagieren. Das jetzt vorliegende Substanzgemisch wird als sogenanntes Massenspektrum nach den Kriterien des Molekulargewichtes und dem mengenmäßigen Auftreten der einzelnen Gewichtsfraktionen registriert. Die Lage der Peaks gibt das Molekulargewicht, die Höhe der Peaks die Menge der jeweiligen Gewichtsfraktion wieder. Die Verteilung von "Fragment-Peaks" ist für das Substrat spezifisch.

3.2.6.2.1. Das Massenspektrum gibt Auskunft über das Molekulargewicht einer Substanz. Aus den Gesetzmäßigkeiten bei der Fragmentbildung kann man auf strukturelle Eigenschaften schließen und somit das vorliegende Molekül bestimmen. Die oben genannten Autoren stellen fest, daß die Massenspektren für POL, PAL und PAM charakteristisch und die Substanzen einzeln oder gemeinsam in der Größenordnung eines /ug oder weniger qualitativ und quantitativ bestimmbar sind. In der folgenden Tabelle 19 sind die Massen der wichtigsten Bruchstück-Peaks von POL, PAL und PAM nach DeJONGH und KORYTNYK (1970) zusammengefaßt.

Tabelle 19: Massengewichtsverteilung der wichtigsten Peaks von POL, PAL und PAM nach DJONGH und KORYTNYK (1970)

Vitamin B ₆	Molekulargewicht der Bruchstücke					
POL	169	151	123	122	106	94
PAL	168	151	123	122	106	94
PAM	167	149	121	120	108	93

3.2.6.3. Die Interpretation der Massenspektren von Vitamin B₆-Derivaten ist eine wertvolle Hilfe bei der Strukturanalyse und -identifizierung des Vitamins (DeJONGH und KORYTNYK 1970). Die Massenspektrometrie kann in Verbindung mit der Gaschromatographie angewandt werden. In diesem Falle wird der Massenspektrograph gleich an den Gaschromatographen angeschlossen.

3.2.7. Infrarotspektroskopische Bestimmungsmethode

3.2.7.1. Auf die Bedeutung und die Anwendungsgebiete der Infrarotspektroskopie weist KORTÜM (1962) sinngemäß folgendermaßen hin: bei der Infrarotspektroskopie treten quantitative analytische Aufgaben gegenüber der Ermittlung von Konstitutionsproblemen zurück. Es interessieren besonders die Zuordnung der beobachteten Banden zu den Normal- und Gruppenschwingungen zur Strukturaufklärung organischer Moleküle. Aber auch die quantitative photometrische Analyse im Infrarotspektrum gewinnt rasch an Bedeutung. Hand in Hand mit dieser Entwicklung hat sich auch die Meßmethodik in wenigen Jahren so außerordentlich vervollkommen, daß sie der Spektroskopie im sichtbaren Bereich und im Ultraviolett-Bereich nicht nachsteht.

3.2.7.2. Als einzige Arbeit der Infrarotspektroskopie des Vitamin B₆ liegt die Veröffentlichung von ANDERSON und MARTELL (1964) vor. Die Autoren untersuchen das Infrarotspektrum von PALP in wässriger Lösung bei verschiedenen pD-Werten mit dem Ziel, die mikroskopische Gleichgewichtskonstante von PALP in wässriger Lösung zu errechnen.

3.2.7.2.1. Ein Problem der Infrarotspektroskopie bei der Untersuchung einer Probe ist es, ein Lösungsmittel für diese Probe zu finden, welches über einen größeren Spektrumbereich genügend "durchlässig" ist. Wasser, das ideale Lösungsmittel für Pyridoxin ist als Lösungsmittel für Infrarotspektroskopie nicht geeignet. Pyridoxin muß deshalb entweder in D₂O gelöst, oder in Nujol fein suspendiert, oder kristallin in KBr-Presslingen untersucht werden. ANDERSON und MARTELL (1964) verwenden Vergleichswerte in denen Pyridoxalphosphat sowohl in D₂O-Phase, als auch in Nujol suspendiert, oder als KBr-Presslinge vorliegt.

3.2.7.2.2. Als qualitative Analysemethode können mit Hilfe der Infrarotspektroskopie die sogenannten "Gruppenfrequenzen" untersucht werden. Diese Gruppenfrequenzen entsprechen dem Resonanzfall einer bestimmten Atomgruppierung eines Substrates.

Die Summe aller Gruppenfrequenzen ist für ein bestimmtes Molekül spezifisch. Um deshalb eine Verbindung identifizieren zu können, ist es notwendig, daß alle den einzelnen Gruppen zugeordneten Banden nachgewiesen werden. Der analytischen Anwendung verdankt die Infrarotspektroskopie ihre außerordentlich rasche Entwicklung. Die unübersehbar gewordene Zahl der Infrarotspektren erfordert besondere Maßnahmen der Dokumentation. Nach KORTÜM (1962) befinden sich folgende Spektrensammlungen im Handel:

- Sadtler-Katalog: dieser Katalog enthielt 1962 20.000 Spektren im Bereich von 2 bis $15/\mu$ und 1000 Spektren im Bereich von 0,8 bis $3/\mu$. Er wird jährlich ergänzt.
- Dokumentation der Molekülspektroskopie (DMS): dieser Katalog umfaßt eine Sammlung von 2000 Literaturkarten und 7000 Substanzkarten.
- American Petroleum Institute Research Project 44 (API 44): 1962 ca. 1800 Spektren von hauptsächlich Kohlenwasserstoffen.
- American Society for Testing Materials (ASTM). Daneben existieren mehrere Sammlungen in Buch oder in Zeitschriftenform.

3.2.7.2.3. Zur quantitativen Erfassung einer Substanz wird aus der Intensität der Absorptionsbande auf die Menge des absorbierenden Stoffes geschlossen. Um aber von dem Extinktionskoeffizienten mit ausreichender Sicherheit auf die Konzentration der vorliegenden Lösung schließen zu können, muß die Schichtdicke der Probe mit der gleichen Genauigkeit bekannt sein. Für die Genauigkeit einer Messung gilt: bei Schichtdicken von ca. 1 mm liegt die Genauigkeit bei wenigen ‰, bei Schichtdicken von ca. 0,1 mm liegt die Genauigkeit bei $\pm 5\%$ (KORTÜM 1962). Mit Hilfe der Mikrospektrometrie erhält man von 5 bis 10×10^{-6} g Substanz befriedigend scharfe Spektren. Liegt die Probe in Form eines einzelnen Kristalles vor, dann beträgt die Nachweisgrenze ca. 10^{-7} g.

3.2.7.3. ANDERSON und MARTELL (1964) gelingt die qualitative Bestimmung von PALP dadurch, daß sie drei charakteristische Gruppenresonanzen im Vergleich mit den Gruppenresonanzen von

2-, 3-, 4-Pyridol, Pyridin und Pyridoxal identifizieren. Es sind die Resonanzen der Carbonylfunktion, die Resonanz der (N^+-D)-Funktion und die Resonanzen der ($C-O^-$), sowie ($O-D$)-Bindungen.

3.2.7.4. An diese Untersuchungsergebnisse knüpfen die Autoren keine speziellen Vitamin B_6 -Nachweismethoden an und geben auch keine Hinweise auf verwendete Mengen und ihre Nachweisgrenzen. Dennoch ist es mit Sicherheit zu erwarten, daß auch die Infrarotspektroskopie zum Nachweis von Vitamin B_6 herangezogen wird.

3.2.8. Isotopenmethode

3.2.8.1. Eine Sonderstellung innerhalb der physikalischen Nachweismethoden nimmt der Nachweis des Isotopenmarkierten Pyridoxin in der Literatur ein. FRAGNER (1964/65) zitiert die Autoren NEJSEL und POMOSCNIKOVA (1953), die mit Hilfe von radioaktivem Isotop ^{32}P die Konzentrationsänderung des Phosphations in Hefekulturen verfolgten. Seither beschäftigt sich eine große Anzahl Autoren mit der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung des Vitamin B_6 , der Umwandlung der einzelnen Derivate ineinander und dem Katabolismus. Sie verwenden dazu isotopenmarkiertes Vitamin B_6 . Diesen Versuchen liegt grundsätzlich die Erkenntnis von BOOTH und BRAIN (1963) zu Grunde, daß sich der Metabolismus von isotopenmarkiertem Pyridoxin nicht von dem des unmarkierten unterscheidet.

3.2.8.2. Die Wahl des verwendeten Isotops ist durch seine Halbwertszeit und durch die Technik der Markierung gegeben. Tritium-markiertes Pyridoxin ist das bevorzugt verwendete Isotop, ^{32}P wurde außer von NEJSEL und POMOSCNIKOVA (1953) nicht mehr verwendet. Die Isotopenaktivitäten werden vornehmlich szintigraphisch wieder sichtbar gemacht. COX, MURRAY und BOONE (1962), CONTRACTOR und SHANE (1968) verwenden Filme zur Aufzeichnung der Isotopenaktivitäten. Die Verwendung von Filmen hat sich nicht bewährt, da diese zu lange belichtet werden müssen. CONTRACTOR und SHANE (1968) belichten zwischen

24 und 120 Stunden, COX, MURRAY und BOONE (1962) erhalten selbst nach einer Belichtungszeit von 4 Wochen unbefriedigende Ergebnisse.

3.3. Die chemischen Bestimmungsmethoden

3.3.1. Allgemeines

3.3.1.1. Der chemische Nachweis des Vitamin B₆ ist neben dem biologischen Test die älteste Bestimmungsmethode für dieses Vitamin; Untersuchungen von Avitaminosen an biologischen Organismen erbrachten den Beweis von der Vitaminaktivität des Pyridoxin. Umgekehrt wurden in der Folgezeit an Hand künstlich induzierter Avitaminosen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden entwickelt. Chemische Untersuchungen trugen zur genauen Klärung der Struktur des Vitamin B₆-Moleküls bei (STILLER, KERESZTESY und STEVENS 1939, KUHN und LÖW 1939). Umgekehrt hat sich ein Teil der zur Untersuchung des Vitamin B₆-Moleküls durchgeführten Reaktionen als chemische Methode der Vitamin B₆-Bestimmung in der Folgezeit durchsetzen können. So beobachteten z.B. STILLER, KERESZTESY und STEVENS (1939), daß Pyridoxin mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid einen blauen Farbkomplex bildet, der innerhalb weniger Minuten zerfällt. HOCHBERG, MELNICK und OSER (1944 a und b) arbeiteten diese Farbreaktion zu einer empfindlichen kolorimetrischen Vitamin B₆-Bestimmung aus.

3.3.1.2. Die chemischen Bestimmungsmethoden reichen von der maßanalytischen Titration (STROHECKER und HENNING 1963, GSTIRNER 1965) über die absorptionsphotometrischen Messungen zu den emissionsphotometrischen Bestimmungen des Vitamin B₆. Auf die bewußte Trennung von chemischen und physikalischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden ist in der Einleitung hingewiesen worden. Im Gegensatz zu den "physikalischen Bestimmungsmethoden" erfolgt die "chemische Vitamin B₆-Bestimmung" grundsätzlich in zwei Schritten: 1) durch eine chemische Reaktion wird das vorliegende Pyridoxinderivat charakteristisch ver-

ändert, und 2) erfaßt die anschließende Messung nicht, wie bei den physikalischen Methoden, das unveränderte Vitamin B₆-Molekül, sondern ist auf die Messung des Reaktionsproduktes abgestellt.

Aus diesem Schema kann man ersehen, daß sich der chemische Nachweis gegenüber dem physikalischen Nachweis grundsätzlich durch eine erhöhte Spezifität auszeichnen kann, da der Messung eine für das Vitamin B₆ charakteristische Reaktion vorausgeht! Andererseits ist aber auch die Fehlerwahrscheinlichkeit und Störanfälligkeit des chemischen Analysengangs größer, da der Streubreite der chemischen Reaktion die Streubreite bei dem Meßvorgang hinzuzuzählen ist.

3.3.1.3. Über 20 verschiedene Reaktionen sind für die einzelnen Vitamin B₆-Derivate oder für das Gesamtvitamin B₆ beschrieben worden. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) stellen ein Modell für alle diese Reaktionen am Vitamin B₆-Molekül auf. Diese Reaktionen beruhen

- auf der phenolischen OH-Gruppe,
- auf der phenolischen OH-Gruppe mit unsubstituierter Para-stellung,
- auf der Reaktivität der α -Methylgruppe,
- auf der Bildung von Phthaleinen,
- auf der Öffnung des Pyridinringes mit Zyanogen-Bromid und
- auf der Reaktivität der 4-Formylgruppe.

An alle diese Reaktionen müssen folgende Ansprüche gestellt werden:

- das Reaktionsprodukt muß für das vorliegende Substrat ausreichend spezifisch sein.
- Der Reaktionsablauf soll schnell und quantitativ verlaufen und mit einfachen Mitteln durchführbar sein.
- Das Reaktionsprodukt muß sich mit Standardmeßmethoden gut messen lassen und thermo- und lichtstabil sein.
- Die Messungen müssen in einem breiteren pH-Bereich und größerem Zeitintervall durchgeführt werden können, ohne daß man Ungenauigkeiten in Kauf nehmen muß.

3.3.1.4. Neben den maßanalytischen Bestimmungsmethoden (STROHECKER und HENNING 1963, GSTIRNER 1965) geben die Autoren kolorimetrische, photometrische und spektrophotometrische Vitamin B₆-Bestimmungen an. Vergleicht man die Bezeichnungen für ein und dieselbe Meßmethode, so kann man mitunter erhebliche Abweichungen von Autor zu Autor feststellen. Dies soll an folgendem Beispiel erläutert werden: SIEGEL und BLAKE (1962) beschreiben ihre Methode als "spektrophotometrische" Bestimmung, GSTIRNER (1965) übernimmt das Verfahren als "photometrische" Bestimmung und STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) reihen diesen Nachweis unter die "kolorimetrischen" Bestimmungsverfahren ein. Die Tabelle 20 vermittelt einen Überblick über verschiedene chemische Reaktionen mit dem Vitamin B₆ und ihre unterschiedlichen Zuordnung in die Systematik der Meßmethoden.

KORTÜM (1962) trennt die kolorimetrischen, photometrischen, spektrophotometrischen und fluorometrischen Meßmethoden voneinander und definiert sie. An Hand dieser Definitionen muß man feststellen, daß die Bezeichnungen nicht beliebig gegeneinander auswechselbar sind. Um eine übersichtliche und logische Gliederung der Meßmethoden aufstellen zu können, sollen sie unter den Überbegriffen "Absorptionsmessung" und "Emissionsmessung" eingeteilt werden. Die kolorimetrischen, photometrischen und spektrophotometrischen Methoden sollen der Absorptionsphotometrie, die fluorometrischen und spektrofluorometrischen Methoden sollen der Emissionsphotometrie zugeordnet werden. Die Frage, ob eine kolorimetrische, photometrische etc. Methode vorliegt, soll soweit als möglich nach den Angaben in der Originalliteratur erfolgen. Die chemischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden werden in der vorliegenden Arbeit folgendermaßen eingeteilt:

- maßanalytische Titration
- absorptionsphotometrische Messung
- emissionsphotometrische Messung

3.3.2. Maßanalytische Bestimmungen

STROHECKER und HENNING (1963), GSTIRNER (1965) beschreiben als einzige Autoren maßanalytische Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden.

Tabelle 20: Unterschiedliche Zuordnung bestimmter chemischer Bestimmungsmethoden in die Systematik der Meßmethoden durch verschiedene Autoren

Originalmethode	colorimetrisch	photometrisch	fluorometrisch
Diäthyl-para-phenyl- diamin	FRAGNER (1964/65)	GSTIRNER (1965) STROHECKER, HENNING (1963)	
2,6-Dichlorochinon- chlorimid	FRAGNER (1964/65) STORVICK, BENSON, EDWARDS, WOODRING (1964)	GSTIRNER (1965) STROHECKER, HENNING (1963)	
Sulfanilsäure	KUHN, LÖW (1939) FRAGNER (1964/65) STORVICK, BENSON EDWARDS, WOODRING (1964)	GSTIRNER (1965)	
Methode nach SIEGEL, BLAKE (1962)	STORVICK, BENSON, EDWARDS, WOODRING (1964)	GSTIRNER (1965)	SIEGEL, BLAKE (1962)
Phenylhydrazin	STORVICK, BENSON, EDWARDS, WOODRING (1964)	WADA, SNELL (1962)	
Methode nach BONAVITA, SCARDI (1959)	STORVICK, BENSON, EDWARDS, WOODRING (1964)		GSTIRNER (1965)

Diese sind die Titrationen des Pyridoxol und Pyridoxal mit Perchlorsäure nach USP XVI (GSTIRNER 1965, STROHECKER und HENNING 1963) und die Titration von Pyridoxol mit Thiosulfat nach SZABOLCS (1955).

3.3.2.1. Wasserfreies POL- und PAL-HCl in Substanz werden in einer Eisessig-Quecksilberacetatlösung (1:1) unter schwachem Erwärmen gelöst. Diese Lösung wird nach Zugabe eines Indikators mit 0,1 n Perchlorsäure bis zum Umschlag nach grün titriert. Der Indikator ist nach GSTIRNER (1965) eine Methylrosaanilinlösung, nach STROHECKER und HENNING (1963) eine α -Naphtholbenzeinlösung. 1 ml der 0,1 n Perchlorsäure entspricht dabei 20,565 mg Pyridoxolhydrochlorid und 20,363 mg Pyridoxalhydrochlorid.

3.3.2.2. Nach SZABOLCS (1955) erfolgt die Vitamin B₆-Bestimmung in pharmazeutischen Präparaten durch Bromierung des Pyridoxin und der anschließenden Titration mit Thiosulfat. Eine Lösung mit POL wird mit KBrO₃ und KBr versetzt und mit HCl angesäuert; nach 45 Minuten wird KJ zugesetzt, nach weiteren 5 Minuten kann mit 0,1 n Thiosulfatlösung titriert werden. Aneurin und Lactoflavin stören diesen Versuch nicht, wenn im Dunkeln gearbeitet wird.

3.3.2.3. Diese beiden maßanalytischen Bestimmungsmethoden zeichnen sich durch geringe Spezifität und sehr geringe Empfindlichkeit aus. Sie können zu kaum mehr, als zur quantitativen Bestimmung relativ großer Vitaminmengen in pharmazeutischen Präparaten verwendet werden. Sie sollen deshalb auch nur der Vollständigkeit halber erwähnt sein. Weit bessere Methoden stehen zur Vitamin B₆-Bestimmung zur Verfügung. KORTÜM (1962) bezeichnet die lichtelektrische Titration der Kolorimetrie und der Photometrie als ein präzises und vielseitig anwendbares Werkzeug der analytischen Chemie. Eine Verbindung der maßanalytischen Methode mit den Methoden der Kolorimetrie und Photometrie im Sinne einer lichtelektrischen Titration wären deshalb denkbar! Jedoch sind die Pyridoxinbestimmungen der oben beschriebenen Art zu unspezifisch und so

wenig empfindlich, daß sich eine Kombination mit der präzisen Methode der Kolorimetrie und Photometrie nicht lohnen würde.

3.3.3. Absorptionsphotometrische Bestimmungen

Untersucht man die Schwächung eines Lichtstromes durch Zwischenschaltung eines absorbierenden Stoffes, so spricht man von Absorptionsphotometrie (KORTÚM 1962). Kolorimetrische, photometrische und spektrophotometrische Messungen der Vitamin B₆-Umwandlungsprodukte sollen unter dem Begriff der absorptionsphotometrischen Bestimmung zusammengefaßt werden. Die absorptionsphotometrischen Bestimmungsmethoden umfassen Farbreaktionen des Vitamin B₆, die nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) in die folgenden Reaktionsgruppen eingeteilt werden:

- Reaktion an der phenolischen OH-Gruppe
- Reaktion an der phenolischen OH-Gruppe mit unsubstituierter Parastellung
- Reaktion an der α -Methylgruppe
- Reaktion unter Bildung von Phthaleinen
- Reaktion unter Öffnung des Pyridinringes
- Reaktion an der 4-Formylgruppe

3.3.3.1. Reaktion an der phenolischen OH-Gruppe

3.3.3.1.1. STILLER, KERESZTESY und STEVENS (1939), GREENE (1939) beschreiben die kolorimetrische Bestimmung des Pyridoxin mit Eisen-III-Chlorid. STROHECKER und HENNING (1963) haben mit FeCl₃ eine kolorimetrische Vitamin B₆-Bestimmungsmethode ausgearbeitet:

5 ml einer Pyridoxollösung (10 mg%) werden mit 1 ml einer 2%igen Eisen-III-chlorid-Lösung versetzt. Das Reaktionsprodukt ist ein rot-brauner Niederschlag. Dieser Niederschlag wird hierauf im Photometer bei der Wellenlänge 450 nm gemessen. Als Blindlösung dient eine 2%ige FeCl₃-Lösung, die mit 5 ml H₂O verdünnt ist.

Diese Reaktion ist eine bekannte Phenolreaktion und für Pyridoxol nur bedingt spezifisch. Nach STROHECKER und HENNING (1963) ist dieser Nachweis für serienmäßige Dosierungskontrollen in

pharmazeutischen Präparaten geeignet, wenn Pyridoxol bereits auf andere Weise nachgewiesen worden ist und keine anderen mit FeCl_3 reagierenden Substanzen, wie z.B. Phenole und Ascorbinsäure, enthalten sind. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) lehnen diese Bestimmungsmethode aus Mangel an Spezifität ab.

FeCl_3 -Lösungen finden jedoch als Sprühreagenz der Vitamin B_6 -Autographie bei chromatographischen Methoden Anwendung. Nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) enthalten die Sprühreagenzien folgender Autoren FeCl_3

Tabelle 21: Verwendung von FeCl_3 in Sprühreagenzien als Autographiemethode

Autor	Sprühreagenzlösung	Bemerkung
SAKURAGI und KUMMEROW (1959)	4%ige Äthanollsg. von FeCl_3	
WADE und MORGAN (1955)	0,1% FeCl_3 und 7% Sulfo- salizylsäure in 75%igem Äthanol	Autographie- methode für PALP und PAMP
PETERSON und SOBER (1954)	wie WADE und MORGAN	

3.3.3.1.2. FOLIN und DENIS (1915) beschreiben eine Nachweismethode für Phenole mit Hilfe von Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure. Phenole bilden mit diesen sogenannten Folin-Denis-Reagenz einen tiefblauen Farbkomplex. KUHN und LÖW (1939) arbeiteten mit diesem Reagenz eine kolorimetrische Bestimmungsmethode aus. Es gelang ihnen 0,02 bis 0,08 mg Pyridoxin mit Hilfe eines Stufenphotometers zu bestimmen. Trübungen und weiße Niederschläge, wie sie bei Phenolen nicht auftreten, störten die Messungen. GYÖRGY urteilte 1951, daß diese Nachweismethode aus Mangel an Spezifität keine allgemeine Anerkennung fand. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) zitieren die Autoren MAIWALD und MASKE (1956), welche Folin-Denis-Reagenz als Sprühreagenz bei der Vitamin B_6 -Autographie verwendeten.

3.3.3.2. Reaktion an der phenolischen OH-Gruppe mit unsubstituerter Parastellung

In diese Reaktionsgruppe gehören die Reaktionen des Pyridoxin

mit: -p-Nitroanilin

-p-Anisidin

-Sulfanilsäure

-p-Aminoacetophenon

-2,6-Dichlorchinonchlorimid

-2,6-Dibromchinonchlorimid

-Diäthyl-p-Phenylendiamin

-4-Amino-6-chlor-m-benzoldisulfonamid

3.3.3.2.1. Vitamin B₆ bildet mit p-Nitroanilin einen Azofarbstoff. Diese Reaktion wurde bereits 1940 beschrieben, fand aber als Nachweismethode keine Beachtung. In der Folgezeit wurde auf diese Reaktion, als zu unspezifisch und zu wenig versprechend, nicht mehr eingegangen. FRAGNER (1964/65), STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) und AHRENS und KORYTNYK (1970) beschreiben dagegen die Herstellung von diazotiertem p-Nitroanilin als Sprühreagenz bei der Autographie von Vitamin B₆, bei der Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese.

p-Nitroanilin wird in konzentrierter HCl gelöst und auf ca. 1:10 verdünnt. Zu 4 ml dieser Lösung werden 5 ml 1%iger eisgekühlter NaNO₂-Lösung gegeben und auf ca. 100 ml verdünnt.

Diazotiertes p-Nitroanilin bildet mit Vitamin B₆ einen orangefarbenen Farbkomplex, der etwas beständiger ist, als die Farb-reaktion mit dem Gibbs-Reagenz.

3.3.3.2.2. Als einzige Autoren diskutieren PETERSON und SOBER (1954) die modifizierte Pauly-Reaktion als Autographiemethode für phosphorylierte Vitamin B₆-Derivate. Diazotiertes p-Anisidin liefert nur schwache Färbung und bewährt sich nicht.

3.3.3.2.3. KUHN und LÖW (1939), BINA, THOMAS und BROWN (1943) beschreiben die Kupplungsreaktion des Vitamin B₆ mit diazo-

tierter Sulfanilsäure. Während nach KUHN und LÖW (1939) der gebildete Azofarbstoff für eine quantitative Vitamin B₆-Bestimmung zu unbeständig ist, fanden BINA, THOMAS und BROWN (1943) Sulfanilsäure als Nachweisreaktion des Pyridoxin in biologischem Material als durchaus geeignet. Der gebildete Azofarbstoff vermindert innerhalb von 24 Stunden seine Intensität um nur 15 %. Dennoch ist die Reaktion von p-Sulfanilsäure und Pyridoxin zu unspezifisch und zu wenig empfindlich, so daß sie als Vitamin B₆-Nachweismethode fallen gelassen wurde. (FRAGNER 1964/65, STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING 1964) Trotzdem zitieren STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) die Autoren MAIWALD und MASKE (1956), welche diazotierte Sulfanilsäure als Sprühreagenz der Pyridoxinautographie verwenden.

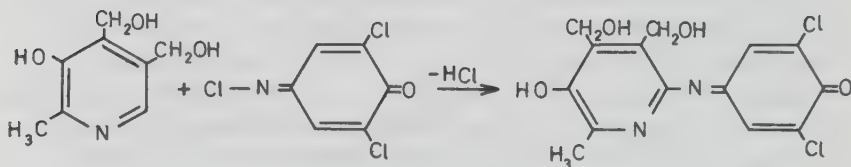
3.3.3.2.4. BROWN, BINA und THOMAS (1945) beschreiben die Diazo-Reaktion des Pyridoxin mit p-Aminoacetophenon in biologischem Material; sie erreichen die beachtliche Nachweisgrenze von 0,5 bis 2 µg/ml, doch ist der gebildete Azofarbstoff wenig stabil. Die Farbe beginnt nach wenigen Minuten zu verblassen. Die Farbreaktion wird bei 420 nm gemessen, erreicht nach 3 bis 5 Minuten ihren Maximalwert und beginnt nach weiteren 2 Minuten merklich zu verblassen.

SILIPRANDI, SILIPRANDI und LIS (1954) verwenden eine p-Aminoacetophenon als Sprühlösung der Vitamin B₆-Autographie bei der Papierelektrophorese. Diese Lösung wird nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) folgendermaßen angesetzt:

die folgenden drei Lösungen a, b, c werden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 2:10:10 vermischt. a) 3,18 g p-Aminoacetophenon werden in 45 ml HCl-conc. gelöst und auf 1 l mit Wasser verdünnt. b) 2,25 g NaNO₂ werden in 100 ml Wasser gelöst. c) 25 g Natriumacetat werden in 100 ml Wasser gelöst.

3.3.3.2.5. Vitamin B₆ wird durch das 2,6-Dichlorchinonchlorimid (Gibbs-Reagenz) in einen blauen Indophenolfarbstoff übergeführt. Das Schema für diese Reaktion wird in Figur 6 wiedergegeben.

Figur 6: Reaktion von Vitamin B₆ mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid unter Bildung eines blauen Indophenolfarbstoffes



Diese Reaktion wurde von STILLER, KERESZTESY und STEVENS (1939) ein erstes Mal beschrieben und SCUDI (1944) arbeitete diese Farbreaktion zu einer sehr empfindlichen Vitamin B₆-Bestimmungsmethode aus. Ihm gelang es noch 0,5 µg bei 650 nm zu photometrieren. Dieser Nachweis wird aber durch Störfaktoren erheblich beeinflusst: Kreatin, Kreatinin, Phenylhydrazin, Hydroxylamin und Thiamin stören diesen Nachweis durch eine gelbe, Harnstoff durch eine rosa und Furfural durch eine grüne Färbung.

3.3.3.2.5.1. Um diese Störfaktoren zu eliminieren verwendet SCUDI (1944) Borsäure. Nach ROTH und SURBORG (1968) bildet Borsäure mit Pyridoxol einen ganz spezifischen Bispyridoxolboratkomplex, der dann durch das 2,6-Dichlorchinonchlorimid nicht mehr erfaßt wird. Photometriert man dann jeweils zwei gleiche Analysenproben mit und ohne Borsäurezusatz, ist die Differenz der Extinktion zwischen beiden Proben das Maß für die wirklich vorhandene Pyridoxolmenge.

3.3.3.2.5.2. HOCHBERG, MELNICK und OSER (1944 a und b) vereinfachten diese Methode und arbeiteten sie zu einer Bestimmungsmethode des Pyridoxin in pharmazeutischen Präparaten um. Die wichtigsten Unterschiede zu der Methode nach SCUDI sind 1) das Puffersystem: in dem alkalischen NH₄OH/NH₄Cl-Puffer erreicht die Farbreaktion schon nach 60 bis 80 Sekunden nach Reagenz-

zugabe ihr Maximum, während sich bei SCUDI (1944) erst nach 20 Minuten optimale Farbentwicklung einstellt. 2) Während SCUDI (1944) das Idophenolblau in der Benzolphase abzentrifugieren muß um es dann zu messen, arbeitet HOCHBERG, MELNICK und OSER (1944 a und b) im einphasigen System, weil die Färbung innerhalb von 80 Sekunden gemessen sein muß.

Die Methode nach HOCHBERG, MELNICK und OSER (1944 a und b) wurde in vereinfachter Form in die USP XVI zur Pyridoxolbestimmung in Tabletten, Injektionslösungen, Multivitamin-kapseln und Multivitamin-tabletten sowie in das DAB VII 1963 zur Gehaltsbestimmung des Pyridoxolhydrochlorid in Vitamin B₆-Tabletten aufgenommen.

Zur vereinfachten Durchführung der Pyridoxolbestimmung mit dem Gibbs-Reagenz werden zwei Reagenzgläser vorbereitet; sie enthalten jeweils 6 ml isopropylalkoholische Analyse-lösung und 2 ml Ammoniak-Ammoniumchloridpuffer. In das eine Reagenzglas wird 1 ml Borsäure hinzugegeben, in das andere statt dessen 1 ml Wasser. In beide Lösungen wird rasch hintereinander je 1 ml 2,6-Dichlorchinonchlorimidreagenz pipettiert, und die Lösungen nach 60 bis 80 Sekunden nach der Zugabe des Reagenz bei 620 nm gegeneinander photometriert. Während die eine Lösung Blaufärbung zeigt, bleibt die Färbung im anderen Reagenzglas weitgehend aus. Die Differenz der Extinktion entspricht der Menge des Pyridoxol, die an Hand einer Eichkurve ermittelt werden kann.

3.3.3.2.5.3. SCEMAMA (1958) bestimmte in Abwandlung dieser Methode Pyridoxin im Harn photometrisch. RICHTER (1962) arbeitete eine Vitamin B₆-Bestimmungsmethode mit Gibbs-Reagenz in stärkereichem biologischen Material aus. Beide Verfahren werden auch von GSTIRNER (1965) diskutiert.

3.3.3.2.5.4. 2,6-Dichlorchinonchlorimid findet häufig als Sprühreagenz der Vitamin B₆-Autographie Verwendung. AHRENS und KORYTNYK (1969 und 1970) sprühen eine 1%ige 2,6-Dichlorchinonchlorimidlösung in Äthanol oder Benzin gelöst auf die Platte und setzen diese Platte entweder Ammoniakdämpfen aus, oder be-

sprühen sie mit einer Ammoniak- oder Natronlauge-Lösung. FUKUI und SAKAZAWA (1955) und RODWELL, VOLCANI, IKAWA und SNELL (1958), SAKURAGI und KUMMEROW (1959) und BURG, RODWELL und SNELL (1960) verwenden ebenfalls 2,6-Dichlorchinonchlorimid zur Vitamin B₆-Autographie.

Ein entscheidender Nachteil der Methode nach HOCHBERG, MELNICK und OSER (1944 a und b) ist die Unbeständigkeit des Farbkomplexes. Nach RICHTER (1962) behält der Farbstoff für mindestens 5 Minuten seinen Maximalwert bei, wenn man ihn mit Amylalkohol ausschüttelt. Nach GSTIRNER (1965) verwenden LEURQUIN und HERMANN (1962) zur Stabilisierung des Farbstoffes Dioxan. ALIEV (1964 a und b, 1968) stabilisiert diesen Farbkomplex mit Zinkionen.

3.3.3.2.6. Nach FRAGNER (1964/65) verwenden CANBÄCK und LINDHOLM (1954) in Abwandlung der Methode nach SCUDI (1944), statt des Gibbs-Reagenz, 2,6-Dibromchinonchlorimid. Diese Methode bewährt sich aber bei komplizierteren Systemen nicht.

3.3.3.2.7. URBANYI und BUDVARI (1968) beschreiben die kolorimetrische Bestimmung von Pyridoxolhydrochlorid, Norphinsulfat und einem Steroid mit 4-Amino-6-chloro-m-benzoldisulfonamid. Auf die Bestimmung des Alkaloids und des Steroids soll nicht weiter eingegangen werden. Die Reaktion mit Vitamin B₆ findet an der Para-Stellung der phenolischen OH-Gruppe statt.

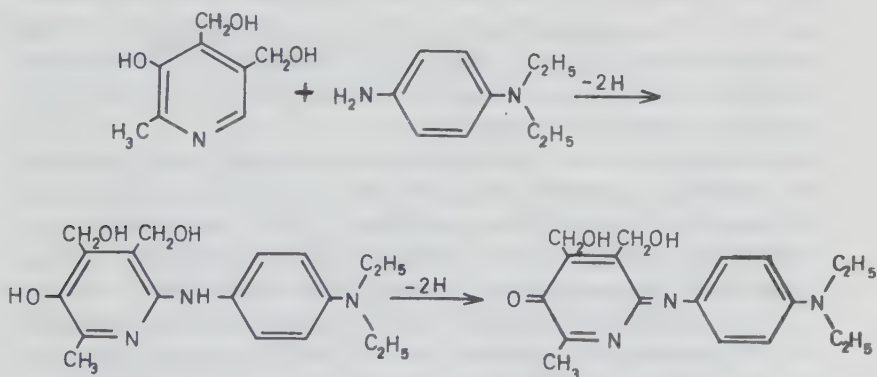
Zu diesem Zweck werden 1 ml des Disulfonamid-Reagenzes (1%ige methanolische Lösung von 4-Amino-6-chloro-m-benzoldisulfonamid und 1%ige wässrige Lösung von Natriumnitrit und 1 n HCl) und 1 ml der Analysenlösung zusammengegeben. Acetat-Puffer stellt den pH-Wert auf 5,3 bis 6 ein. Die spektrophotometrische Messung erfolgt nach 5 Minuten bei 467 nm.

Pyridoxol bildet mit dem Reagenz einen orange-roten Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 467 nm aufweist. Optimale Farbintensität erhält man durch Verwendung von Methanol als Lösungsmittel der Analysenlösung und einer 1 n Natriumacetatpufferlösung von pH 5,3 bis 6. Weiter empfiehlt es sich, nach Reagenzzugabe mindestens 3 Minuten zu warten, um Störungen

durch aufsteigende Blasen zu vermeiden. Die Konzentration des gebildeten Farbkomplexes und die Extinktion sind im Bereich des Absorptionsmaximum von 0 bis 0,04 mg einander proportional und gehorchen dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Den Autoren gelingt mit der beschriebenen Methode die sichere Bestimmung von Pyridoxol in Gegenwart von Lactose, Sucrose und Stärke. Thiamin, Riboflavin, Niacinamid und Cyanocobalamin stören den Nachweis nicht.

3.3.3.2.8. HRDY und URBANOVA (1958) haben eine photometrische Bestimmungsmethode für Pyridoxol in pharmazeutischen Präparaten ausgearbeitet. Diäthyl-p-phenylendiamin bildet mit Pyridoxin in Anwesenheit oxydierender Stoffe einen blauen Indophenolfarbstoff, der bei seinem Absorptionsmaximum von 605 nm photometriert werden kann; (siehe Figur 7)

Figur 7: Reaktion von Vitamin B₆ mit Diäthyl-p-phenylendiamin unter Bildung eines blauen Indophenolfarbstoffes



Der Analysenlösung, die ca. 10-200 µg Pyridoxol enthält, werden 2 ml 0,1 m Phosphatpufferlösung von pH 7, 1 ml von 1 %iger Diäthyl-p-phenylendiamin-Lösung und 10 ml Benzol zugesetzt. Nach Zugabe von 1 ml 1 %iger Kaliumhexacyanoferrat III-Lösung, wird das Gemisch 30 Sekunden lang geschüttelt, die Benzolschicht getrennt, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet

und bei 605 nm photometriert.

Die Spezifität der Reaktion ist mit der Spezifität der Gibbs-Reaktion vergleichbar. Auch dieses Reagenz gibt mit anderen Phenolen eine Färbung; aber auch hier kann durch Zugabe von Borsäure das Reaktionsprodukt des Diäthyl-p-phenylendiamin mit Vitamin B₆ entfärbt werden, während die durch andere Phenole bedingten Färbungen bestehen bleiben. Auf diese Weise bestimmt man durch zwei Vergleichsmessungen mit und ohne Borsäurezusatz den Pyridoxolgehalt. Andere Vitamine des B-Komplexes, ferner Biotin, Methionin, Cholin und Betain stören die Bestimmungen nicht. Zur Beseitigung störender Substanzen, wie Ascorbinsäure, Salicylsäure und Phenole können die Methoden der Vorbestimmung, wie z.B. die Ionenaustauschchromatographie, aber auch andere Verfahren, Verwendung finden. JINDRA (1959/60) trennt Ascorbinsäure von der Analyselösung mit Hilfe von Ionenaustauschern: die Probelösung, die 2-3 mg Pyridoxol und 20 mg Ascorbinsäure enthalten soll, fließt durch einen schwach basischen Anionenaustauscher Amberlite IR-4b, der in Hydroxylform vorliegt. Ascorbinsäure wird quantitativ gebunden. Das POL des Eluates wird durch den darunter stehenden stark basischen Anionenaustauscher Amberlite IRA-401 gebunden. Es wird mit 0,1 N HCl eluiert und anschließend nach HRDY und URBANOVA (1958) photometriert.

Bei Anwesenheit von Ascorbinsäure und anderen reduzierenden Bestandteilen empfehlen die Autoren, die Menge des Oxydationsmittels und des Puffers zu erhöhen. Pro 2,5 mg vermuteter Ascorbinsäure müssen 2 ml Puffer und 1 ml Kaliumhexazyano-ferrat-III-Lösung zugegeben werden. Störende Salicylsäure wird vor der Zugabe der Reagenzien aus der angesäuerten Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Dasselbe gilt auch für andere Phenole mit ähnlichen Löslichkeitseigenschaften wie Salicylsäure.

3.3.3.3. Reaktion an der α -Methylgruppe

KUHN und LÖW (1939) arbeiteten ein kolorimetrisches Verfahren zur Pyridoxolbestimmung aus, welches von FRAGNER (1964/65), STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) und GSTIRNER (1965) diskutiert wird.

Durch Behandlung mit Diazomethan wird Pyridoxin in den o-Methyläther übergeführt. Nach erfolgter Verätherung der phenolischen OH-Gruppe erhält man durch die Anlagerung von entweder Jodmethyl oder Dimethylsulfat oder p-Toluolsulfonsäuremethylester, eine quartäre Pyridiniumverbindung. Diese liefert nach kurzem Erhitzen mit Chloroform oder 20%iger wässriger Kalilauge in Gegenwart von Alkohol violette Farbstoffe der "Carbopyridincyaninreihe". Die Absorptionsbanden des Carbopyridincyanin liegen in alkoholischer Chloroformlösung bei 599 und 555 nm, in 20 %iger Kalilauge bei 592 und 543 nm. Nach KUHN und LÖW (1939) gelingt mit dieser Methode der Nachweis von ca. 0,08 mg - 0,1 mg Pyridoxol.

In der Literatur der Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden finden sich keine Hinweise dafür, daß mit der Methode nach KUHN und LÖW Vitamin B₆-Nachweise durchgeführt worden sind. Es ist auch nicht ersichtlich, ob mit dieser Methode autographische Bestimmungen der Vitamin B₆-Chromatographie durchgeführt worden sind.

3.3.3.4. Reaktion unter Öffnung des Pyridinringes

SWEENEY und HALL schlugen 1952 eine neue Farbreaktion des Vitamin B₆ auf der Grundlage der König-Reaktion vor. KÖNIG konnte zeigen, daß der Pyridinring mit Cyanogenbromid geöffnet werden kann und das Reaktionsprodukt mit aromatischen Aminen einen farbigen Komplex ergibt. Bevor Pyridoxin diese König-Reaktion eingehen kann, müssen die Methylgruppen in einer Vorbehandlung oxydiert werden. Die Oxydation geschieht durch Erhitzen in Schwefelsäure bei 180°C. Als geeigneten Katalysator fanden die Autoren Selen. Dieser Katalysator hat den Vorteil, daß Nikotinsäure unter dieser Vorbehandlung keine König-Reaktion liefert, was die Bestimmung von Pyridoxin neben Nikotinsäure möglich macht. Auf Zugabe des König-Reagenz (Cyanogenbromid und Sulfanilsäure) bildet die neutralisierte Lösung einen gelben Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 480 nm aus.

Die Reaktion nach SWEENEY und HALL (1952) dient zum Nachweis für POL, PAL und PAM. POL und PAL verhalten sich gleich und

werden in der oben beschriebenen Weise nachgewiesen. Die primäre Amonogruppe des PAM muß dagegen vor der Oxydation mit Hilfe von Natriumnitrit und HCl in die phenolische OH-Gruppe übergeführt werden. Nach dieser Umwandlung wird es wie POL und PAL bestimmt.

Die Reaktion nach SWEENEY und HALL (1952) ist eine recht spezifische Bestimmungsmethode für POL, PAL und PAM, mit welcher die Autoren noch ca. 8 µg Vitamin B₆/ml nachweisen. Über die absoluten Nachweisgrenzen liegen keine Angaben vor, dennoch ist anzunehmen, daß auf Grund der Empfindlichkeit dieser Methode, die Bestimmung noch geringerer Konzentration von Vitamin B₆ möglich ist.

3.3.3.5. Reaktion unter Bildung von Phthaleinen

Im Rahmen ihrer Versuche, die Struktur des Pyridoxin aufzuklären, beschreiben STILLER, KERESZTESY und STEVENS (1939) die Kondensation des zur 4,5-Dicarboxylsäure oxydierten Pyridoxin mit Resorzin. Sie erhalten dabei ein stark grünlich-gelb fluoreszierendes Phthalein. Mit dieser Methode ist in der Literatur der Vitamin B₆-Bestimmungen kein weiteres Nachweisverfahren ausgearbeitet worden, obwohl sich nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) diese Methode zur Analyse von Pyridoxin-Reinstpräparaten eignen könnte und FRAGNER (1964/65) diese Methode als sehr empfindlich darstellt.

3.3.3.6. Reaktion an der 4-Formylgruppe

Fünf Reaktionen zum absorptionsphotometrischen Nachweis des Vitamin B₆ sind an die 4-Formylgruppe des Pyridoxinmoleküls gebunden. Es sind dies die Bestimmungsmethoden mit

- Äthanolamin
- Thiophen
- Phenylhydrazin
- Azeton und
- MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolon-Hydrazon-Hydrochlorid)

3.3.3.6.1. METZLER und SNELL (1952) haben eine Nachweismethode von Pyridoxal in Gemischen mit Pyridoxal und Pyridoxamin ausge-

arbeitet. Die Autoren entwickelten diese Methode, um die Reaktionsprodukte PAL und PAM in einer Transaminasereaktion mit Glutaminsäure und α -Ketoglutarat bestimmen zu können.



Die Entwicklung dieser Methode wurde notwendig, nachdem es nach Darstellung der Autoren bis dahin keine schnelle und genaue Einzelbestimmungsmethode für eines der beiden Substrate in einem Gemisch von PAL und PAM gegeben habe.

Zu 5 ml einer PAL-Lösung (0,1 bis 0,7 μmol) werden 5 ml einer 50 % Äthanolaminlösung gegeben. PAL und Äthanolamin bilden einen gelben Farbkomplex, wahrscheinlich eine "Schiff'sche Base" (METZLER und SNELL 1952) die ein Extinktionsmaximum bei pH 11 von 365 nm besitzt. Die Farbreaktion tritt sofort ein, der Farbkomplex ist stabil. (METZLER und SNELL 1952)

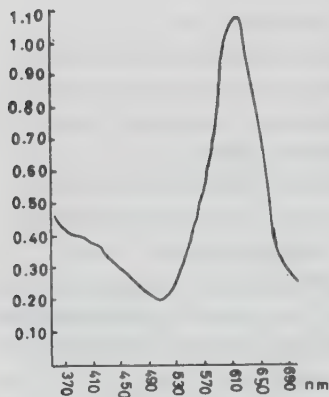
Zur Bestimmung von PAL und PAM in einer Lösung wird bei pH 6,7 und 323,5 nm der Gesamtvitamingehalt spektrophotometrisch gemessen, da beide Vitamin B₆-Derivate bei 325,5 nm und pH 6,7 eine gleich große Extinktion aufweisen. Von diesem erhaltenen Gesamtwert wird jetzt die Menge von PAL nach METZLER und SNELL (1952) bestimmt und abgezogen.

3.3.3.6.2. LEVINE und HANSEN (1959) berichten, daß Pyridoxal einen jadegrünen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 615 nm bildet, wenn es mit Thiophen in Gegenwart von Schwefelsäure auf 75°C erhitzt wird.

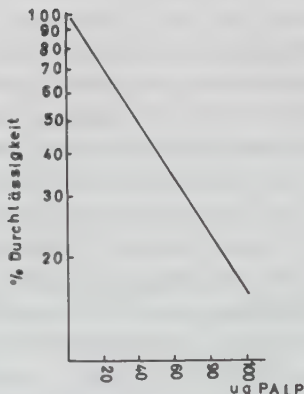
Zu diesem Zweck werden eine Lösung von 0,5 % Thiophen und 80 % H₂SO₄ in die Analysenprobe auf 0°C abgekühlt. 1 ml der Analysenlösung, 1 ml der Thiophenlösung und 8 ml der H₂SO₄-Lösung werden vermischt und auf 75°C erhitzt, bis die Farbentwicklung eintritt. Die Probe wird bei 615 nm spektrophotometrisch gemessen.

Die Figuren 8 und 9 zeigen das Spektrum des Farbkomplexes in Abhängigkeit von der Wellenlänge und die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes für den Farbkomplex in einem Bereich von 1-100 μg .

Figur 8: Spektrum des Farbkomplexes nach LEVINE und HANSEN (1959)



Figur 9: Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes von 1 bis 100 μg (LEVINE und HANSEN 1959)



Diese Methode ist eine spezifische Bestimmungsmethode für Pyridoxal. Pyridoxol, Pyridoxamin und Pyridoxinsäure werden durch diese Reaktion nicht erfaßt. Gelb-rote und orangene Reaktionsprodukte liefern aber auch kürzere aliphatische Aldehyde und Ketone mit Thiophen, wie Acetaldehyd, Glycerinaldehyd, Brenzaldehyd, Aceton, Dihydroxyaceton, Acetoacetat, Brenztraubensäure und Phenylbrenztraubensäure. Alloxan ergibt eine blaue Färbung.

Zur Durchführung der Bestimmung nach LEVINE und HANSEN (1959) müssen die Analysenproben sorgfältig gereinigt und Pyridoxal abgetrennt werden. LEVINE und HANSEN (1959) empfehlen selber die papierchromatographische Technik von SNYDER und WENDER (1953).

3.3.3.6.3. WADA und SNELL (1961) haben eine Methode zur Bestimmung von PAL und PALP entwickelt, welche wie die Methode nach METZLER und SNELL (1952) durch andere Vitamin B₆-Derivate nicht gestört wird. Im Prinzip beruht der Nachweis auf der Hydrazonbildung von PAL und PALP mit einer Reihe aromatischer Hydrazine. Phenylhydrazin liefert die befriedigendsten Ergebnisse

(WADA und SNELL 1961) und bildet mit PALP einen beständigen, intensiv gelben Farbkomplex, der ein Absorptionsmaximum von 410 nm besitzt. PAL reagiert langsamer, aber ergibt nach Erhitzen auf 60° die gleich hohe Extinktion. Die langsame Farbeinstellung des Pyridoxal beruht auf der Tatsache, daß die Verbindung in saurer Lösung als Hemiacetal vorliegt. Diese Extinktion bei 410 nm gehorcht dem Lambert-Beer'schen Gesetz bei einer Konzentration von 0-0,025 mmol. Der Unterschied des Reaktionsablaufes in Abhängigkeit von der Temperatur und dem gewählten pH-Wert kann zur getrennten Bestimmung von PAL und PALP herangezogen werden.

3,8 ml der Analyselösung werden mit 0,2 ml Phenylhydrazinreagenz versetzt. Das Reagenz erhält man, indem man 2 g Phenylhydrazinhydrochlorid in 100 ml 10 n H₂SO₄ auflöst. Wenn PALP in Abwesenheit von PAL bestimmt werden soll, läßt man die Analyselösung 10 Minuten auf Raumtemperatur einstellen. Anschließend wird bei 410 nm photometriert.

Sollen PAL allein, oder PAL und PALP zusammen bestimmt werden, werden die Lösungen 20 Minuten lang auf 60°C erhitzt. Nachdem sie auf Raumtemperatur abgekühlt sind, werden sie bei 410 nm photometriert.

Soll PALP im Überschuß von PAL gemessen werden, genügt es, die Analyselösung auf 0°C abzukühlen und mit 0,5 ml 18 n H₂SO₄ anzusäuern. Das Phenylhydrazinreagenz wird nach 30 Minuten hinzugegeben und die Absorption bei 410 nm photometriert. Unter diesen Bedingungen stören selbst 1,0/μmol PAL die Farbmessung nicht.

WADA und SNELL (1961) beurteilen ihre Nachweismethode folgendermaßen: die Methode ist empfindlicher als die Methode METZLER und SNELL (1952) oder die direkte spektrophotometrische Messung von PALP in 0,1 n NaOH. Die Phenylhydrazinmethode ist weniger empfindlich als die Apotryptophanasemethode nach McCORMICK, GREGORY und SNELL (1961) und die fluorometrische Messung des PAL und PALP als "Cyanohydrine" (WADA und SNELL 1961). Nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) ist die aufgezeigte Reaktion eine sehr befriedigende Bestimmungsmethode von

PAL und PALP in Enzymreaktionsgemischen. WADA und SNELL (1962 a und b) weisen mit der beschriebenen Hydrazinmethode PAL und PALP in enzymatischen Transaminierungsreaktionen nach.

3.3.3.6.4. SIEGEL und BLAKE (1962) beschrieben eine Bestimmungsmethode von Pyridoxal für nicht enzymatische Transaminierungsreaktionen. Diese Methode beruht darauf, daß Pyridoxal dank seiner 4-Formylgruppe im basischen Milieu mit Aceton kondensiert und einen gelben Farbstoff bildet.

1 ml der Analyselösung werden mit 0,6 ml Aceton und 0,4 ml 10 % NaOH versetzt und intensiv vermischt. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur kann das gelbe Reaktionsprodukt bei 420 nm photometriert werden.

SIEGEL und BLAKE (1962) untersuchten den Zeiteffekt auf die Entwicklung des Farbkomplexes und empfehlen, die Farbe schon nach 15 Minuten zu messen, obwohl die Farbentwicklung selbst nach 180 Minuten noch nicht ganz abgeschlossen ist. Weiter stellen die Autoren fest, daß Alanin, Glutaminsäure, α -Ketoglutarat und ähnliche Amino- und Ketosäuren und weiter POL und PAM mit den Reagenzien keine Farbverbindungen eingehen. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) vermuten, daß sich PALP unter den beschriebenen Bedingungen wie PAL verhalten wird, obwohl SIEGEL und BLAKE (1962) keinen Hinweis darauf geben.

3.3.3.6.5. SODA, YORIFUJI, MISONO und MORIGUCHI (1969) beschreiben ausführlich die spektrophotometrische Bestimmung von PAL und PALP mit MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolon-Hydrazon-Hydrochlorid). Diese Methode gestattet den spezifischen, empfindlichen und genauen Nachweis von PAL und PALP einzeln und in Gegenwart des anderen in biologischem Material und anderen komplizierten Systemen. Diese Bestimmung wird durch die anderen Vitamine der B₆-Gruppe, POL, PAM und PAMP nicht gestört. MBTH wurde ursprünglich als Reagenz zum empfindlichen Nachweis von aliphatischen Aldehyden entwickelt. 1965 wird berichtet, daß MBTH mit mehreren Karbonylen, Azine und Osazine mit charakteristischem Spektrum bildet (SODA, YORIFUJI, MISONO und MORIGUCHI 1969). MBTH bildet mit PAL und PALP wahrscheinlich das

3-Methyl-2-Benzothiazolylazin von PAL und PALP, indem es an die Aldehydgruppe des Vitamin gekoppelt wird.

a) Bestimmung von PAL:

zu 1 ml einer PAL-Lösung (0,01-0,2 μ mol) werden 2 ml einer 0,6 m Natriumacetat-Essigsäurepufferlösung von pH 3,4 und 0,8 ml einer 0,14 %igen wässrigen MBTH-Lösung gegeben. Das Gemisch wird 30 Minuten lang auf 50°C erwärmt und nach Abkühlen auf Raumtemperatur bei 430 nm gemessen.

b) Bestimmung von PALP:

zu 1 ml einer 0,01 bis 0,2 μ mol PALP-Lösung und 2 ml einer 0,5 m Kaliumphosphatpufferlösung von pH 8,0 werden 0,8 ml einer 0,1 %igen MBTH-Lösung gegeben. Nach der Erwärmung wie unter a) beschrieben, wird die Lösung bei 380 nm gemessen.

c) Bestimmung von PAL in Gegenwart von PALP:

soll PAL in Gegenwart von PALP, welches bei pH 3,4 unlöslich ist, bestimmt werden, muß das unter diesen Bedingungen unlösliche PALP zusätzlich 5 Minuten lang bei 1500 g abzentrifugiert werden; dann kann die Konzentration von PAL bei 430 nm photometriert werden.

d) Bestimmung von PALP in Gegenwart von PAL:

soll PALP in Gegenwart von PAL gemessen werden, so wird, wie im umgekehrten Fall, 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Anschließend kann PALP bei 380 nm photometriert werden.

Die Autoren diskutieren an Hand umfangreicher Untersuchungen die optimalen Versuchsbedingungen in Abhängigkeit von dem pH-Wert, der Art und der Konzentration der verwendeten Puffersysteme, der Erhitzungsdauer und der Konzentration der MBTH-Lösung. Bei der Bestimmung des PAL eignet sich am besten ein Natriumacetat-Essigsäurepuffer von pH 3,4-3,6 und einer Konzentration von 0,1-0,7 m. Im Gegensatz dazu verwendet man für die Bestimmung des PALP einen Phosphatpuffer mit dem pH von 7,8 - 8 und der Konzentration von 0,1 - 0,7 m. Diesen Analyselösungen setzt man am besten 0,14 % MBTH-Lösung zur Bestimmung des PAL und 0,1 % MBTH-Lösung zur Bestimmung des PALP zu.

Optimale Farbentwicklung tritt bei PAL nach 160 Minuten und 25°C oder nach 25 Minuten und 50°C ein. Der gebildete Farb-

komplex ist bei 50°C mindestens 5 Stunden stabil. PALP entwickelt selbst bei 25°C schon nach ca. 2 Minuten die optimale Farbentwicklung, die bei 25°C mindestens 12 Stunden und bei 50°C 3 Stunden stabil bleibt. Die erheblich schnellere Reaktion des PALP ist dadurch zu erklären, daß es nicht wie PAL im sauren Milieu in der Hemiacetalstruktur vorliegt. In der Konzentration von 0,01 - 0,2 μ mol ist die Extinktion für PAL wie für PALP linear von der Konzentration abhängig. Der molare Extinktionskoeffizient von PAL-Azin ist $2,74 \cdot 10^4$ und des PALP-Azin ist $2,24 \cdot 10^4$. Den Autoren gelang eine Genauigkeit der Bestimmung von $\pm 3\%$. Auf Grund dieser unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten beruht eine zweite Bestimmungsmethode von PALP in Gegenwart von PAL. Die Analyselösung von PAL und PALP wird bei pH 8 mit der MBTH-Lösung versetzt und auf 25°C erwärmt. Wird die Extinktion dieser Lösung nach 120 - 180 Sekunden gemessen, dann erhält man praktisch nur die Werte für PALP, weil PAL zu diesem Zeitpunkt erst in vernachlässigbar geringer Menge zu PAL-Azin umgesetzt ist.

3.3.4. Emissionsphotometrische Bestimmungen

3.3.4.1. Allgemeines

3.3.4.1.1. Dem "direkten fluorometrischen Nachweis" der physikalischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden, steht der "indirekte fluorometrische Nachweis" der chemischen Bestimmungsmethode gegenüber (STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING 1964). Die direkte Fluorometrie mißt die Emissionseigenschaften am unveränderten Pyridoxinmolekül, während das Vitamin B₆ vor der indirekten fluorometrischen Messung chemisch verändert werden muß.

3.3.4.1.2. Zwei Reaktionsmechanismen des Vitamin B₆ liegen dem indirekten fluorometrischen Nachweis zu Grunde; diese Reaktionen wurden nach den gebildeten Endprodukten benannt, die dann fluorometrisch bestimmt werden sollen. Sie wurden von STORVICK und McLEOD PETERS (1964), STORVICK, BENSON, EDWARDS und

WOODRING (1964), TOEPFER und Mac ARTHUR POLANSKY (1964), GSTIRNER (1965) und CONTRACTOR und SHANE (1968) als sogenannte "Lactonmethode" und "Cyanohydrinmethode" diskutiert und beschrieben.

3.3.4.1.2.1. Die Lactonmethode geht auf HUFF und PERLZWEIG (1944) zurück. Ihnen gelang der Nachweis von 4-Pyridoxsäure als inerten Metabolit des Vitamin B₆ im Urin. Sie konnten weiter zeigen, daß 4-Pyridoxsäure durch Erhitzen in saurem Medium in das Lacton übergeführt wird, welches bei pH 9 25 mal stärker fluoresziert als Pyridoxsäure. Diese Erkenntnis führte zur weiteren Entwicklung analytischer Methoden der Vitamin B₆-Bestimmung, die darauf beruhen, daß das jeweilige Vitamin B₆-Derivat über die 4-Pyridoxsäure in das Lacton oxydativ umgewandelt wird und dessen Fluoreszenz gemessen wird.

3.3.4.1.2.2. Die sogenannte "Cyanohydrinmethode" basierte nach BONA VITA und SCARDI (1959) und BONA VITA (1960) auf der Reaktion der Aldehydgruppe von PAL und PALP mit den Cyanidionen unter Bildung des stark fluoreszierenden PALP- und PAL-Cyanohydrin. Auf der Grundlage dieser Methode haben TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY und HEWSTON (1961), YAMADA und SAITO (1965), CONTRACTOR und SHANE (1968) und BONASERA, SMARTO und BONA VITA (1967) teils eigene fluorometrische Bestimmungsmethoden für PAL, PALP, PAM und POL ausgearbeitet oder die Vitamin B₆-Derivate nach einer der beschriebenen Methoden nachgewiesen.

3.3.4.1.2.2.1. In ihren Arbeiten waren sie aber immer davon ausgegangen, daß die spektralen Änderungen von PAL und PALP durch KCN auf die Bildung der jeweiligen Cyanohydrinderivate zurückzuführen ist. Diese Anschauung hatte sich bis 1968 erhalten. OHISHI und FUKUI (1968), TAKANASHI, TAMURA, YOSHINO und IIDAKA (1968), widerlegten die These nach BONA VITA (1960) von der Cyanohydrinbildung durch PAL und PALP bei der Reaktion mit KCN. An Hand umfangreicher Versuchsreihen stellten sie fest, daß die Reaktionsprodukte des PAL und PALP mit KCN das 4-Pyridoxolacton und das 4-Pyridoxsäure-5-Phosphat sind.

3.3.4.1.2.2.2. Der Beweis gelingt OHISHI und FUKUI (1968), indem sie die Reaktionsprodukte der Reaktion von PAL und PALP nach BONAVIDA (1960) mit Reinstpräparationen von 4-Pyridoxolacton und 4-Pyridoxsäure-5-Phosphat vergleichen und bei jeder der diskutierten Vergleichsmethode eine verblüffende Ähnlichkeit oder sogar Identität der Substanzen untereinander feststellen.

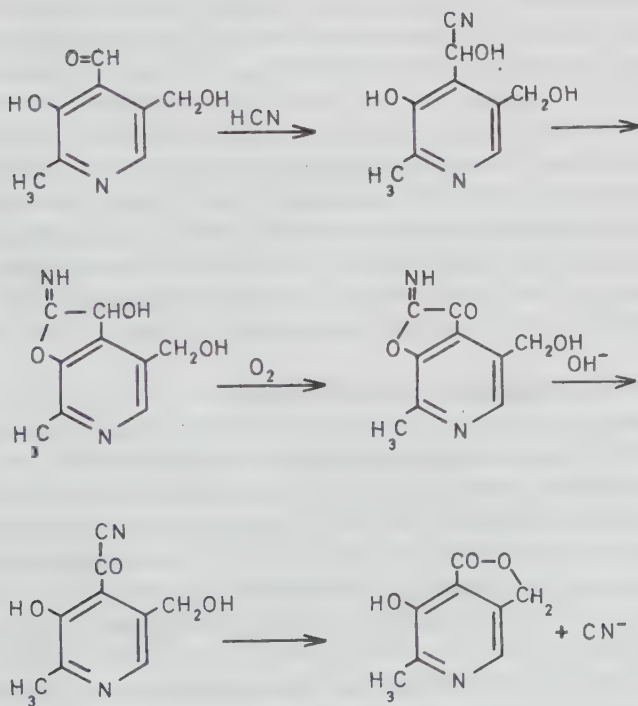
- Der papierchromatographische Vergleich zeigt identische Rf-Werte der untersuchten Reaktionsprodukte mit denen der Reinstpräparate.
- Die Elektrophorese zeigt identisches Verhalten der Reaktionsprodukte mit denen von Pyridoxolacton und Pyridoxsäurephosphat.
- Die Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte zeigen identische Peaks mit denen der Pyridoxolacton- und Pyridoxsäurephosphat-Vergleichslösungen.
- Die Fluoreszenzspektren der Reaktionsprodukte sind mit denen der Vergleichslösung fast identisch.
- Die Charakterisierung der Reaktionsprodukte unter dem Ultraviolettlicht zeigen gute Übereinstimmung mit den Reinstpräparaten.

OHISHI und FUKUI (1968) stellen weiter fest, daß PAL unter experimentellen Bedingungen zu 90 % in Pyridoxolacton und PALP zu 95 - 98 % zu Pyridoxsäurephosphat umgewandelt werden. Bei 438 nm und 420 nm ist die Fluoreszenz der Konzentration in einem Bereich von 10^{-6} - 10^{-8} Mol proportional.

3.3.4.1.2.2.3. TAKANASHI, TAMURA, YOSHINO und IIDAKA (1968) untersuchen den Reaktionsablauf von PAL mit HCN nach BONAVIDA und SCARDI (1959) und stellen fest, daß das Cyanid die Reaktion katalysiert und das Endprodukt 4-Pyridoxolacton unter Umgehung der 4-Pyridoxsäure gebildet wird. Figur 10 zeigt den Reaktionsablauf von PAL und HCN.

3.3.4.1.2.2.4. Da eine umfangreiche Literatur die Vitamin B₆-Nachweismethode nach BONAVIDA einerseits als eigene Bestimmungsgruppe behandelt, es andererseits aber falsch ist, eine Methode nach dem Endprodukt zu benennen, welches nach unseren jetzigen

Figur 10: Bildung von 4-Pyridoxolacton aus Pyridoxal und HCN nach TAKANASHI, TAMURA und JIDAKA (1968)



Erkenntnissen nicht gebildet wird, soll in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung "Cyanohydrinmethode" zu Gunsten der "Cyanidmethode" fallen gelassen werden. Die Bezeichnung "Cyanidmethode" berücksichtigt die katalytische Funktion des Cyanidions an der Oxydation von PAL und PALP, ohne eine neue Einteilung dieser Methode in die Systematik der Vitamin B₆ Bestimmungsmethoden erforderlich zu machen.

3.3.4.2. Fluoreszenzmessung mit Hilfe der Lactonmethode

Die Lactonmethode beruht auf der Fluoreszenzmessung von 4-Pyridoxolacton. Die zu untersuchenden Vitamin B₆-Derivate werden deshalb zuerst zu 4-Pyridoxsäure oxydiert, um anschließend in das Lacton umgewandelt zu werden. Die Lactonmethode war bis 1955 ausschließlich eine spezielle und sehr empfindliche Bestimmungsmethode von 4-Pyridoxsäure im Urin. Der erste Ansatz zur fluorometrischen Bestimmung von POL, PAL und PAM über ihre oxydative Umwandlung und Messung als Lacton, gelang FUJITA, FUJITA und FUJINO (1955 a und b). Eine ganze Reihe Bestimmungsverfahren von POL, PAL, PAM und 4-Pyridoxsäure mit Hilfe der Lactonmethode sind bis heute beschrieben worden.

3.3.4.2.1. Bestimmung von 4-Pyridoxsäure

Obwohl vielmehr ein Metabolit, als eine metabolisch aktive Form des Vitamin B₆, hat die 4-Pyridoxsäure eine wichtige Rolle bei der Erforschung des Vitamin B₆ in der Ernährung gespielt (STORVICK und McLEOD PETERS 1964). Die im Urin ausgeschiedenen Mengen der Pyridoxsäure lassen auf die Vitamin B₆-Ernährungslage, und somit auf Mangelzustände und Abbauege des Vitamins schließen. HUFF und PERLZWEIG (1944), SARETT (1951), FUJITA, FUJITA, FUJINO (1955 b), FUJITA und FUJINO (1955), REDDY, REYNOLDS und PRICE (1958) und WOODRING, FISHER und STORVICK (1969) arbeiteten Nachweismethoden für 4-Pyridoxsäure im Urin aus.

3.3.4.2.1.1. HUFF und PERLZWEIG (1944) wiesen als erste 4-Pyridoxsäure im Urin nach, indem sie die Fluoreszenz des

Lactons bestimmen.

1 ml Urin werden mit 9 ml 1:10 verdünnter HCl conc.

15 Minuten im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wird mit Natriumborat der pH-Wert auf $9 \pm 0,3$ eingestellt und die Fluoreszenz gemessen.

Die Nachweisgrenze liegt bei 0,04 $\mu\text{g/ml}$ 4-Pyridoxolacton. Diese an und für sich empfindliche Methode ist durch ein unsicheres Ergebnis bei ihrer speziellen Anwendung mit Urin charakterisiert, da andere fluoreszierende Substanzen im Urin den Nachweis stören. In der Tat wird mit der Methode nach HUFF und PERLZWEIG (1944) mehr Pyridoxsäure im Urin nachgewiesen, als Vitamin B₆ aufgenommen wurde.

3.3.4.2.1.2. SARETT (1951) versucht das Problem der störenden Fluoreszenzen im Urin dadurch zu eliminieren, daß er den Versuchspersonen vor den Messungen hohe Dosen Pyridoxin verabreicht, die den 4-Pyridoxsäurespiegel im Urin erheblich ansteigen lassen. Der Urin wird anschließend stark verdünnt. Die Verdünnung bewirkt dann, daß der Anteil der Störfaktoren gegenüber der 4-Pyridoxsäure verringert wird.

3.3.4.2.1.3. Nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) bestimmen FUJITA, FUJITA und FUJINO (1955 b) 4-Pyridoxsäure nach ihrer Reinigung an der Ionenaustauschsäule.

10 ml des Eluates werden mit 2 ml 6 n HCl versetzt und 15 Minuten lang auf 100°C erhitzt. Nach Abkühlen wird mit 6 n NH₄OH der pH-Wert auf etwa 9,5 eingestellt und die Lösung auf 25 ml verdünnt. Anschließend wird die Fluoreszenzmessung durchgeführt.

3.3.4.2.1.4. REDDY, REYNOLDS und PRICE (1958) trennen 4-Pyridoxsäure vor der Bestimmung an Dowex 1- und Dowex 50-Säulen auf. Die quantitative Bestimmung gliedern die Autoren in Delactonisierung, Lactonisierung, pH-Einstellung und Verdünnung sowie fluorometrische Messung.

Durch das Auswaschen der 4-Pyridoxsäure aus der Dowex 50-Säule mit 2 n HCl tritt bei Raumtemperatur spontane Lactonisierung auf. Aus diesem Grund muß die Lösung durch

Zugabe von 5 n NaOH und 5 Minuten dauernder Erhitzung auf 100°C entlactonisiert werden. Zur Lactonisierung wird die Lösung mit HCl neutralisiert und weiter mit 2 ml 5 n HCl versetzt und 15 Minuten auf 100°C erhitzt. Nach der Lactonisierung wird der pH-Wert nach HUFF und PERLZWEIG (1944) mit Natriumborat auf $\text{pH } 9,0 \pm 0,3$ gebracht. Die Fluoreszenzmessung erfolgt mit einem Coleman 12 Photofluorometer bei 350 nm Aktivierungsfrequenz und 450 nm Erregungsfrequenz.

3.3.4.2.1.5. WOODRING, FISHER und STORVICK (1969) beschreiben eine Mikromethode zur Bestimmung von 4-Pyridoxsäure im Urin. Die Autoren verwerten in ihrer Methode die bewährtesten Analyseschritte der Methoden nach FUJITA, FUJITA und FUJINO (1955 b), FUJITA und FUJINO (1955) sowie REDDY, REYNOLDS und PRICE (1958). Die Präparation der Urinproben, die chromatographische Trennung und die Delactonisierung werden von REDDY, REYNOLDS und PRICE (1958), die Lactonisierung und Messung von FUJITA, FUJITA und FUJINO (1955 b) und FUJITA und FUJINO (1955) übernommen und die Mengen im Maßstab 1:10 verringert. Die Methode nach WOODRING, FISHER und STORVICK (1969) ist spezifisch und liefert reproduzierbare Ergebnisse. Die Empfindlichkeit liegt bei 0,2 µg/ml Urin.

3.3.4.2.2. Bestimmung von Pyridoxol

FUJITA, MATSUURA und FUJINO (1955) haben eine Bestimmungsmethode für Pyridoxol ausgearbeitet, diese wird von HENNESSY, STEINBERG, WILSON und KEAVENEY (1960) in einigen Punkten verbessert und vereinfacht. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) arbeiteten eine Mikrobestimmungsmethode nach der Methode von FUJITA, MATSUURA und FUJINO (1955) aus.

3.3.4.2.2.1. Das Prinzip der POL-Bestimmungsmethode nach FUJITA, MATSUURA und FUJINO (1955) beruht darauf, daß die saure äthanolische POL-Lösung durch 2 ml einer 2 %igen Kaliumpermanganatlösung zu Pyridoxsäure oxydiert wird. Nach 50 Sekunden werden die Permanganatüberschüsse mit 2 ml einer 3 %igen H_2O_2 -Lösung entfernt. Zur Lactonisierung wird die Probe nach Zugabe

von 3 ml 6 n HCl 8 Minuten lang auf 100°C erhitzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 9 - 10 mit 3 n NaOH und 3 n NH_4OH wird die Fluoreszenz gemessen.

3.3.4.2.2.2. Das Prinzip der fluorometrischen Messung von POL nach HENNESSY, STEINBERG, WILSON und KEAVENEY (1960) baut auf der Versuchsanordnung von FUJITA, MATSUURA und FUJINO (1955) auf, wurde aber dieser Methode gegenüber dadurch verbessert, daß der pH-Wert der Lösung nicht mit NaOH und Na_4OH , sondern mit Versen und Rochellesalz auf pH 9,5 eingestellt wird. Nach STROHECKER und HENNING (1963) hat sich diese Modifikation bei der Untersuchung von mit Pyridoxol angereicherten Lebensmitteln bestens bewährt.

3.3.4.2.2.3. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) haben auf Grundlage der Methode nach FUJITA, MATSUURA und FUJINO (1955) eine Mikromethode ausgearbeitet, in der die Mengen der verwendeten Lösungen im Verhältnis von etwa 1:10 verringert wurden. Mit dieser Mikromethode kann die Bestimmung von Pyridoxol in Gegenwart von Pyridoxal ohne weiteres durchgeführt werden, es sei denn, Pyridoxal überwiegt bei weitem.

3.3.4.2.3. Bestimmung von Pyridoxal

3.3.4.2.3.1. FUJITA, FUJITA und FUJINO (1955 b) und FUJITA und FUJINO (1955) haben eine Lactonbestimmungsmethode für Pyridoxal ausgearbeitet, welche von STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) zu einer Mikrobestimmungsmethode modifiziert wurde. Das Prinzip der PAL-Bestimmung beruht darauf, daß PAL im basischen Bereich durch AgNO_3 und 40 Minuten dauernder Erhitzung auf 100°C zu 4-Pyridoxsäure oxydiert wird. Die Lactonisierung erfolgt nach HUFF und PERLZWEIG (1944). Nach Einstellen des pH-Wertes auf 9 - 10 durch 5 ml 3 n NaOH kann das Lacton gemessen werden.

3.3.4.2.3.2. Auf gleiche Weise verfahren STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) zur Bestimmung des Pyridoxal. Sie verringern die Menge der Reagenzien auf ca 1/10 der von FUJITA und Mitarbeiter verwendeten Mengen. Die Messung des PAL

kann in Gegenwart von POL und PAM ohne Störung durchgeführt werden. Pyridoxsäure dagegen muß vor der Durchführung der Bestimmung sorgfältig entfernt werden.

3.3.4.2.4. Bestimmung von Pyridoxamin

3.3.4.2.4.1. FUJITA, MATSUURA und FUJINO (1955), FUJITA, FUJITA und FUJINO (1955 a) sowie STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) haben zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung von PAM ausgearbeitet. Da PAM nicht direkt zu Pyridoxsäure oxydiert werden kann, muß nach FUJITA und Mitarbeiter PAM vor der Oxydation durch Natriumnitrit zu Pyridoxol desaminiert werden. Dieser Desaminierungsschritt schließt sich der chromatographischen Trennung an der Permutitsäule an. PAM wird dann anschließend wie POL nachgewiesen. Liegen PAM und POL in einer Lösung nebeneinander vor und soll die Menge von PAM bestimmt werden, so werden zwei Bestimmungen durchgeführt. Die 1. Bestimmung erfaßt das vorhandene POL vor dem Desaminierungsschritt, die 2. Bestimmung erfaßt die Gesamtmenge POL nach der Desaminierung. Die Differenz zwischen beiden Messungen entspricht dem Betrag von PAM.

3.3.4.2.4.2. Nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) wird PAM vor der Bestimmung nach der Methode von METZLER und SNELL (1952) in PAL übergeführt. METZLER und SNELL (1952) berichteten, daß bei nichtenzymatischer Transaminierungsreaktion zwischen PAM und Glyoxylsäure das Gleichgewicht auf der Bildung von PAL liegt. Diese Methode wurde von STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) mit Glyoxylsäure als Substrat und CuSO_4 als Katalisator übernommen. Die Transaminierung von PAM zu PAL findet zu 73 - 75 % statt. Die Methode liefert reproduzierbare Ergebnisse und ist zur Untersuchung von PAM in biologischem Material als Mikromethode entwickelt worden.

Zur Umwandlung von PAM in PAL werden 200 μl 0,0014 m Natriumglyoxalsäure, 10 μl 0,004 m CuSO_4 und 600 μl eines 0,02 m Ammoniumacetat/Essigsäurepuffer miteinander vermischt und im Wasserbad 30 Minuten lang gekocht. Das erhaltene PAL wird jetzt nach FUJITA und Mitarbeiter mit AgNO_3 zu 4-Pyridoxsäure oxydiert und weiter lactonisiert.

3.3.4.3. Fluoreszenzmessung mit Hilfe der Cyanidmethode

3.3.4.3.1. Eigenschaften der Cyanidmethode

Die Cyanidmethode ist in ihrer ursprünglichen Form als Bestimmungsmethode für PAL und PALP entwickelt worden. Auf die gebildeten Reaktionsprodukte wurde in der Einführung hingewiesen. Während die Reaktionsprodukte, das Pyridoxosäurelacton und das Pyridoxsäurephosphat bekannt sind, ist der Reaktionsablauf und die Rolle der Cyanidionen noch nicht eindeutig geklärt.

3.3.4.3.1.1. Zur Untersuchung der Reaktionsmechanismen führen OHISHI und FUKUI (1968) die Reaktionen von PAL und PALP mit KCN unter Luftabschluß durch. Sie stellen fest, daß auf Zugabe von KCN zu PAL ein scharfer Peak bei 353 nm und ein kleiner Peak bei 250 nm entsteht. Bei der Reaktion des PALP entsteht unter Luftabschluß ein Peak bei 357 nm. Diese Spektren ändern sich sofort bei Luftzutritt an das Reaktionsgemisch und entsprechen dann den Spektren von Pyridoxolacton und Pyridoxsäurephosphat. OHISHI und FUKUI (1968) führen die Ausbildung dieser unter Luftabschluß gewonnenen Spektren auf die Bildung von Zwischenprodukten hin.

3.3.4.3.1.2. Obwohl man in Bezug auf das gebildete Reaktionsprodukt lange Zeit von der falschen Annahme ausgegangen war, ändert sich an der Spezifität und dem Wert der Cyanidmethode als Vitaminbestimmungsmethode nichts. Die Cyanidmethode gestattet den spezifischen Nachweis für PAL und PALP in biologischem Material, pharmazeutischen Präparaten, etc.. PAL kann in Gegenwart von PALP und PALP in Gegenwart von PAL bestimmt werden.

POL reagiert nicht mit KCN. Um dennoch POL mit Hilfe der Cyanidmethode nachweisen zu können, wird nach TOEPFER und Mac ARTHUR POLANSKY (1964) die Oxydation des POL in PAL beschrieben.

PAM reagiert nach BONAVIDA (1960) ebenfalls nicht mit KCN. Um es mit Hilfe der Cyanidmethode nachweisen zu können, muß es nach METZLER und SNELL (1952) in bereits beschriebener Art mit Glyoxylsäure transaminiert werden. TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY

und HEWSTON (1961) haben auf dieser Grundlage eine PAM-Bestimmungsmethode ausgearbeitet.

3.3.4.3.1.3. Die Empfindlichkeitsgrenze der Cyanidmethode liegt nach STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) für PALP und PAL bei Konzentrationen um 10^{-8} m und ist damit um den Faktor 10^3 größer als die Empfindlichkeitsgrenze der spektrophotometrischen Messung. TAMURA und TAKANASHI (1970) erreichen mit dem Hitachi-Fluoreszenz-Spektrophotometer MPF-2A für PAL eine Nachweisgrenze von ca. $1 \cdot 10^{-10}$ Mol (20 ng PAL). Im Vergleich zu den kolorimetrischen Meßmethoden ist die Cyanidmethode wesentlich empfindlicher und spezifischer.

3.3.4.3.2. Bestimmung von PAL und PALP

BONAVITA (1960) und YAMADA, SAITO und TAMURA (1966 a und b) beschreiben Bestimmungsmethoden von PAL und PALP mit Hilfe der Cyanidmethode. Die Tabelle 22 vermittelt eine Übersicht über die Autoren, die bestimmten Vitamin B₆-Derivate und die Bedingungen unter denen die Messungen durchgeführt werden.

3.3.4.3.2.1. BONAVITA (1960) arbeitete als erster Autor die Bestimmung von PAL und PALP mit KCN aus.

Zur Bestimmung von PAL werden 3 ml Analyselösung mit 0,1 ml 0,003 m Kaliumcyanidlösung versetzt, mit 0,2 m Natriumphosphatpuffer der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und durch 30 Minuten dauernde Erwärmung auf 50°C zur Reaktion gebracht. Die Fluoreszenzmessung wird bei pH 7,55 unter den Bedingungen in der Tabelle 22 ausgeführt.

PALP wird auf gleiche Weise mit KCN zur Reaktion gebracht, doch genügt es dabei, die Lösung auf 25°C zu erwärmen. Zur Fluoreszenzmessung wird die Lösung auf pH 3 - 3,8 eingestellt.

BONAVITA (1960) stellt fest, daß PALP mit KCN bei 25°C innerhalb von 30 Minuten vollständig umgesetzt ist. Unter den selben Bedingungen ist PAL jedoch nur zu 23,7 % umgesetzt. Auf Grund dieser unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeit und dank der starken pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz der Reaktions-

Tabelle 22: Bewährte Methoden der Bestimmung von PAL und PALP mit Hilfe der Cyanidmethode

Autor	Vitamin B ₆	Messungsbedingungen		
		pH-Wert	Erreger- Frequenz	Emmissions- Frequenz
BONAVITA (1960)	PAL	7,55	358 nm	430 nm
	PALP	3,8	313- 315 nm	420 nm
TAKANASHI und TAMURA (1970) und TAMURA und TAKANASHI (1970)	PAL	10,0	356 nm	432 nm
	PALP	3,0	318 nm	418 nm
YAMADA, SAITO und TAMURA (1966 a und b)	PAL	10,0	358 nm	438 nm
	PALP	3,8	325 nm	420 nm
ADAMS (1969 a und b)	PALP	3,8	325 nm	420 nm
TOEPFER und Mac ARTHUR POLANSKY (1964)	PAL	9,5	358 nm	435 nm

produkte, kann PALP in Gegenwart von PAL gemessen werden, wenn PAL nicht zu stark überwiegt.

Als wesentlichste Störfaktoren für seine Methode sieht BONAVIDA (1960) die Störung der Fluoreszenzmessung durch andere Substanzen an. In diesem Fall empfiehlt BONAVIDA (1960) elektrophoretische und chromatographische Auftrennungen als Vorbestimmungsmethoden.

3.3.4.3.2. YAMADA, SAITO und TAMURA (1966 a und b) haben in Anlehnung an BONAVIDA (1960) eine Cyanidbestimmungsmethode für PAL und PALP in Blut und Organen ausgearbeitet.

Um PALP zu bestimmen, werden 2 ml des durch Ionenaustauschchromatographie gereinigten Eluats mit 2 ml 0,2 m Phosphatpuffer und 0,1 ml 0,05 m KCN-Lösung versetzt und bei 50°C 30 Minuten lang erwärmt. Nach Abkühlen wird mit 1 ml 0,5 n Weinsäure der pH-Wert auf 3,8 eingestellt und die Probe nach den Bedingungen in der Tabelle 22 fluorometrisch gemessen.

Um PAL zu bestimmen, werden 2 ml der Analyselösung mit 5 ml 0,02 m Phosphatpuffer und 0,1 ml 0,05 m KCN-Lösung 120 Minuten lang auf 50°C erwärmt. Vor der Fluoreszenzmessung wird die Lösung mit Natriumkarbonat auf pH 10 eingestellt.

Im Gegensatz zu BONAVIDA (1960) erhalten YAMADA, SAITO und TAMURA (1966 a und b) erst nach 30 bzw. 120 Minuten optimale Fluoreszenzen. Weiter empfehlen die Autoren, sofort nach pH-Einstellung zu messen, da die gebildeten Reaktionsprodukte nicht stabil sind. In Bezug auf Empfindlichkeit stellen YAMADA, SAITO und TAMURA (1966 a und b) fest, daß die Empfindlichkeit für PAL mit der Empfindlichkeit enzymatischer Methoden vergleichbar und die Empfindlichkeit für PALP etwas geringer als die der enzymatischen Methoden ist.

3.3.4.3.3. Bestimmungen von Vitamin B₆-Derivaten nach ihrer Umwandlung in Pyridoxal

Angesichts der außerordentlichen Empfindlichkeit, Schnelligkeit und Spezifität der Cyanidmethode, besonders bei der PAL-Bestimmung, gegenüber den anderen physikalischen, kolorimetrischen

und photometrischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden ist es naheliegend, auch andere Vitamin B₆-Derivate in PAL überzuführen, um diese dann als 4-Pyridoxsäurelacton bestimmen zu können.

3.3.4.3.3.1. TAKANASHI, MATSUNAGA und TAMURA (1970), TAKANASHI und TAMURA (1970) und TAMURA und TAKANASHI (1970) haben für PAL und PALP eine Bestimmungsmethode in biologischem Material ausgearbeitet. Die Autoren führen die Hydrolyse des PALP mit saurer Phosphatase aus Rattenleber und Kartoffel durch, die nach den Methoden anderer Autoren gewonnen werden. Von den verwendeten Enzymen bewährt sich die saure Phosphatase der Kartoffel. Mit 0,15 - 0,20 E pro 1 n - Mol PALP erzielen sie 99 - 98 %ige Hydrolyse von PALP, dagegen gelingt es ihnen mit saurer Rattenphosphatase nur ca. 90 % des PALP zu hydrolysieren.

Im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse führten sie auch Säurehydrolysen mit 2 n und 0,2 n H₂SO₄ bei 100°C durch. Dabei erhielten sie für anorganischen Phosphor erheblich höhere Werte als für PAL. Die Diskrepanz beim Vergleich der erhaltenen Werte für PAL und anorganischen Phosphor läßt die Vermutung zu, daß PAL durch die Hydrolyse teilweise zersetzt werden muß (TAKANASHI und TAMURA 1970). Nach durchgeführter Hydrolyse wird das PAL in der oben beschriebenen Art zu 4-Pyridoxolacton oxydiert.

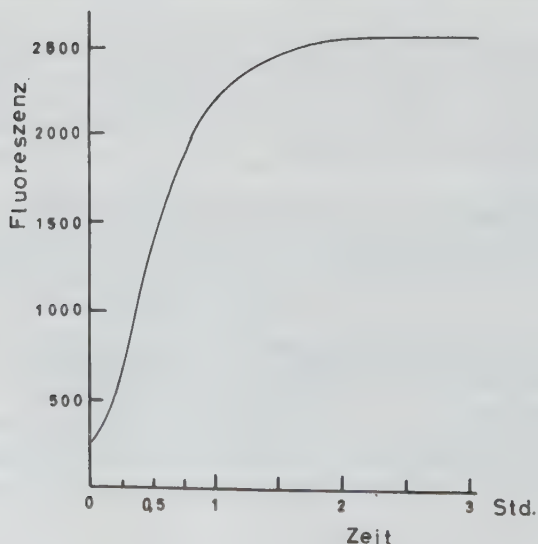
Zur Messung von PAL werden 5 ml Analyselösung in Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 0,1 ml 0,1 m KCN 90 - 120 Minuten lang auf 50°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung bei pH 10 fluorometrisch gemessen.

3.3.4.3.3.2. TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY und HEWSTON (1961) haben eine Bestimmungsmethode für PAM in den Konzentrationen von 0,001 - 1,0 µg/ml mit Hilfe der Cyanidmethode ausgearbeitet. Die Autoren führen die Transaminasereaktion nach der Methode METZLER, OLIVARD und SNELL (1954) aus. Die Bestimmung des gebildeten PAL erfolgt genau in der von BONAVIDA (1960) angegebenen Weise.

Zur Transaminierungsreaktion von PAM zu PAL werden 5 ml einer PAM-Lösung mit 10 ml einer 0,2 m K_2HPO_4 Lösung (pH 7,5) und 1 ml einer 0,005 m Kalium-Alaun-Lösung ($AlK(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$) und 1 ml 0,05 m Natrium-Glyoxalat zusammengegeben. Die Mischung wird 15 Minuten lang auf 100°C erhitzt, das gebildete PAL wird nach dem Abkühlen nach BONAVIDA (1960) bestimmt.

Die Transaminierungsreaktion mit Glyoxalat läuft nach TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY und HEWSTON (1961) bei pH 7,4 sehr schnell ab und soll nach METZLER, OLIVARD und SNELL (1954) theoretisch 70 % PAL liefern. Zur Cyanidreaktion nach BONAVIDA (1960) ist zu bemerken, daß die 4-Pyridoxolactonbildung erst nach zwei Stunden abgeschlossen ist. Dieses kann aus Figur 11 entnommen werden.

Figur 11: Bildung von 4-Pyridoxolacton nach TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY und HEWSTON (1961).



Die Fluoreszenzmessung wird bei pH 9,5 und 435 nm bei einer Aktivierungsfrequenz von 358 nm gemessen. Störende Fluoreszenzen können nach TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY und HEWSTON (1961) vernachlässigt werden. Die Methode zeichnet sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus. Nebenprodukte der Transaminierungsreaktion, die METZLER, OLIVARD und SNELL (1954) diskutieren, können TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY und HEWSTON (1961) nicht entdecken. Die Autoren führen insgesamt 19 verschiedene PAM-Bestimmungen unabhängig voneinander durch und erzielen dabei eine hohe Übereinstimmung der Meßergebnisse. Die Abweichungen betragen $\pm 2,5 \%$.

3.3.4.3.3. Nach TOEPFER, Mac ARTHUR POLANSKY (1964) haben POLANSKY, CAMARRA und TOEPFER (1964) eine Methode zur quantitativen Oxydation des POL in PAL in den Konzentrationen von 0,001 - 0,1 $\mu\text{g/ml}$ mit Mangandioxyd ausgearbeitet. Bei Raumtemperaturen und einem pH-Wert von 5 - 6 läuft die Reaktion in 30 Minuten ab. Nach dem Entfernen des Mangandioxyd kann das PAL nach der Methode nach BONAVIDA (1960) bestimmt werden. Es ist kaum zu bezweifeln, daß mit Hilfe dieser Reaktion eine Bestimmungsmethode für POL entwickelt werden kann, welche mit der für PAL und PAM vergleichbar ist.

3.4. Die enzymatischen Bestimmungsmethoden

3.4.1. Allgemeines

Die phosphorylierte Form des Vitamin B_6 wird im tierischen Organismus für mehr als 30 enzymatische Umwandlungen als Coenzym benötigt. PALP wirkt im Eiweißmetabolismus als Coenzym von Decarboxylasen, Transaminasen. Auf Grund dieser Erkenntnisse entwickelten UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) ein enzymatisches Vitamin B_6 -Bestimmungsverfahren und leiteten so die jüngste Nachweismethode für das Vitamin B_6 , den enzymatischen Test ein.

3.4.1.1. Die enzymatischen Vitamin B_6 -Bestimmungsmethoden werden in der vorliegenden Arbeit in eine "direkte" und in eine

"indirekte" Bestimmung unterteilt.

3.4.1.1.1. Bei den sogenannten indirekten Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden erhält man über die Transaminasespiegel des Plasmas, oder die Xanthurensäureausscheidung im Urin, Auskunft darüber, ob ein Vitamin B₆-Mangel im Organismus vorliegt oder nicht. Pyridoxinmangel wirkt sich als Verminderung des SGPT und SGOT-Spiegels aus. Störungen im Vitamin B₆-Haushalt lassen sich auch über den Tryptophanmetabolismus als Erhöhung der Xanthurensäureausscheidung nachweisen. THIELE und BRIN (1968), YUKIO und MAEDA (1965), RAICA und SAUBERLICH (1964), ZIEGLER, REINKEN und BERGER (1969), STANULOVIC, MILETIC und STOCK (1967) und LaDUE, WROBLEWSKI und KARMEN (1954) haben über diese indirekten Bestimmungsmethoden Vitamin B₆-Mangelzustände im Organismus festgestellt. Die Höhe des SGOT- und SGPT-Spiegels als auch die Xanthurensäureausscheidung im Urin sind von großem klinischen Interesse; sie sind eine qualitative Aussage über Angebot und Verwertung von Vitamin B₆ im Organismus und können auf Störungen im Kreislaufsystem und in der Leber Hinweise geben. Als Methoden der Vitamin B₆-Bestimmung sind die indirekten Verfahren nicht geeignet, da man über sie keine quantitativen Vitaminwerte erhalten kann. Sie sollen deshalb in der vorliegenden Arbeit auch nicht weiter behandelt werden.

3.4.1.1.2. Das Prinzip der direkten enzymatischen Vitamin B₆-Bestimmung ist es, ein Enzym, dessen Coenzym das Vitamin B₆ ist, auf ein Substrat wirken zu lassen. Über die Reaktionsprodukte kann die Aktivität des Enzyms als Funktion der Coenzymkonzentration bestimmt werden.

3.4.1.2. Damit nehmen die enzymatischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden eine Zwischenstellung zu den chemischen Methoden einerseits und den mikrobiologischen Bestimmungsmethoden andererseits ein. Bei den chemischen Methoden wurde die Vitaminbestimmung durch eine beliebige Reaktion am Vitamin B₆-Molekül gemessen. Bei den mikrobiologischen Bestimmungsverfahren erfolgt die Bestimmung der Vitaminkonzentration ausschließlich über

die Messung des definierten Wirkungseffektes "Wachstum", den das Vitamin als Summe aller Einzelreaktionen im Enzymsystem des Organismus bewirkt. Es spielt dabei keine Rolle, ob für und die Einzelwirkungen des Vitaminfaktors im Enzymsystem des Organismus überschaubar sind, oder nicht. Ganz anders ist es bei den enzymatischen Bestimmungsmethoden: hier wird die Geschwindigkeit der Einzelreaktion in einem Enzymsystem, welches das Vitamin B₆ als Cofaktor enthält, gemessen.

3.4.1.3. Als Vorteil der enzymatischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden werden immer wieder die außerordentliche Empfindlichkeit und hohe Spezifität herausgestellt. Enzymatische Bestimmungen sind einfach und schnell durchzuführen. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch die fast ausschließliche Empfindlichkeit der enzymatischen Methoden für die phosphorylierten Formen des Vitamin B₆, PALP und PAMP. Lediglich Tyrosindecaboxylase enthält Pyridoxalphosphokinase, die bei ATP-Zugabe PAL zu PALP aktiviert. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) verweisen auf die Enzymgruppe der Aminoxydasen, die in der Kaninchenleber, in bestimmten Säugerorganen und in Mikroorganismen vorkommt und in der Lage ist, PAMP zu PALP, aber auch PAM zu PAL zu oxydieren. Mit Hilfe dieses Enzyms könnte die Grundlage dazu geschaffen werden, daß auch diese Form des Vitamin B₆ enzymatisch bestimmt werden kann.

3.4.1.4. Der Versuchsaufbau der enzymatischen Bestimmung gliedert sich in

- Darstellung des APO-Enzyms
- Vorbereitung der Analyseproben
- Durchführung der Bestimmung und der
- Messung

3.4.1.4.1. Vier verschiedene Enzymsysteme fanden bisher zur Vitamin B₆-Bestimmung Verwendung. Es sind dies die

- Tyrosindecaboxylase aus *Streptococcus faecalis*
- Apotryptophanase aus *Escherichia coli*
- Transaminase aus Bierhefe
- Apophosphorylase aus Kaninchenmuskel

Bakterien und Hefen müssen zu diesem Zweck auf besonderen Kulturnährmedien gezüchtet und geerntet werden. Zur Gewinnung des Apoenzyms werden die Zellen gewöhnlich durch Ultraschall aufgebrochen, das Zellplasma abzentrifugiert und eingeeengt. Zur Abtrennung des Coenzyms wird das Enzym in der Regel gegen Wasser dialysiert.

3.4.1.4.2. Als Verfahren zur Extraktion von PALP aus dem Probenmaterial konnte sich die alkalische Hydrolyse nach WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) gegenüber der sauren Hydrolyse mit HPO_3 durchsetzen. Das zur Untersuchung stehende Gewebe wird homogenisiert, das Homogenat mit NaOH oder KOH versetzt, kurz im Wasserbad erhitzt und sofort wieder auf 0°C abgekühlt. Die Analyseprobe wird aus dem abzentrifugierten Überstand entnommen. Dabei ist zu bedenken, daß PALP außerordentlich licht- und temperaturempfindlich ist. DONKERLO (1964) hat Vorsichtsmaßnahmen für die Extraktion und die Durchführung des Versuches beschrieben:

- die PALP-Lösungen werden im Kühlschrank in schwarzen Gefäßen aufbewahrt, die mit 0,1 n NaOH versetzt sind. Betragen die Halbwertszeiten für PALP bei Tageslicht ca. 60 Minuten, konnten die so aufbewahrten Lösungen mindestens 1 Monat gelagert werden.
- Die Standardlösungen werden immer im eisgefüllten Behälter aufbewahrt und nur kurzzeitig herausgenommen.
- Die Warburg-Flaschen werden solange unter dunkler Abdeckung gehalten, bis sie ins Wasserbad gestellt werden.
- Die Gefäße mit Gewebsextrakt werden in aufgebohrte Holzblöcke gestellt. Die endgültigen Verdünnungen werden im Eisbehälter aufbewahrt.
- Alle Arbeiten werden im gedämpften Licht durchgeführt.

3.4.1.4.3. Zur Durchführung der Bestimmung werden meist Apoenzym und Analyseprobe praeinkubiert, daraufhin mit dem Substrat versetzt und anschließend bebrütet.

3.4.1.4.4. Die Enzymaktivität wird je nach Methode direkt über eine gekoppelte Reaktion bestimmt. Bei der Tyrosindecarboxylase- und Apotryptophanasemethode werden die direkt entstehenden Reaktionsprodukte CO_2 und Indol gemessen. Bei der Transaminasemethode nach SCHREIBER (1970) kann Oxalacetat, das Reaktionsprodukt der coenzymabhängigen Reaktion, über eine zweite gekoppelte Reaktion meßbar gemacht werden. Als weitere Besonderheit der enzymatischen Bestimmungsmethoden wurden Verfahren entwickelt, bei denen isotopenmarkierte Substrate Verwendung finden. Dies ist bei der Tyrosindecarboxylase- und Apotryptophanasemethode der Fall. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt dann mit Hilfe von Zählgeräten, die den Autoren eine noch schnellere und noch genauere Messung ermöglichen.

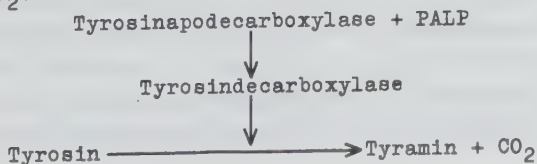
3.4.1.5. Die Einteilung der enzymatischen Vitamin B_6 -Bestimmungsmethoden sollen in der vorliegenden Arbeit entsprechend den verwendeten Enzymen erfolgen. Es sind dies:

- Tyrosindecarboxylase
- Apotryptophanase
- Transaminase
- Apophosphorylase

3.4.2. Tyrosindecarboxylasemethode

3.4.2.1. Versuchsaufbau

3.4.2.1.1. Nach GALE und EPPS (1944) haben UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) die erste enzymatische Vitamin B_6 -Bestimmungsmethode mit Hilfe der Tyrosindecarboxylase entwickelt. Das Enzym Tyrosindecarboxylase setzt sich aus dem Apoenzym und dem relativ leicht abdissozierbaren Coenzym PALP zusammen. Das Apoenzym wird aus Streptococcus faecalis ATCC 8043 dargestellt, das Coenzym ist PALP. Die Tyrosindecarboxylase decarboxyliert nach folgendem Reaktionsschema L-Tyrosin zu Tyramin und CO_2 :



3.4.2.1.2. Die Menge des pro Zeiteinheit entweichenden CO_2 ist der Menge des hinzugegebenen PALP in bestimmten Grenzen proportional, wenn Tyrosinapodecarboxylase und Tyrosin im Überschuß hinzu gegeben werden. Die Menge des entweichenden CO_2 ist eine Funktion der Reaktionsgeschwindigkeit. Um über die Reaktionsgeschwindigkeit die PALP-Konzentration messen zu können, haben UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) eine manometrische Meßmethode entwickelt, die von den Autoren BOXER, PRUSS und GOODHART (1957), GUNSALUS und SMITH (1957), WACHSTEIN, KELLNER und ORTIZ (1960), LABOUESSE, CHATAGNER und JOLLES-BERGERET (1960), MAYOR, CASCALES, MARCOS und SANTOS RUIZ (1962) und DONKERLO (1964) unverändert, oder leicht modifiziert, übernommen worden ist. Diese Methoden werden zum Nachweis von PALP in tierischem Gewebe, Leukozyten und Blutplasma verwendet.

3.4.2.1.3. Einen ganz anderen Weg zur Messung der Reaktionsgeschwindigkeit haben HAMFELT (1962, 1964, 1967), MARUYAMA und COURSIN (1968), CHABNER und LIVINGSTON (1970) und SUNDARESAN und COURSIN (1970) gewählt. Sie verwenden ^{14}C -markiertes Tyrosin, das entweder in radioaktives Tyramin und kaltes CO_2 oder in kaltes Tyramin und radioaktives CO_2 abgebaut wird. Die Reaktionsprodukte werden dazu vor ihrer Ausmessung mit Hilfe von Zählgeräten papier- oder gaschromatographisch aufgetrennt.

3.4.2.2. Manometrische Bestimmung

UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1946) beschreiben die manometrische Bestimmung von PAL und PALP in pharmazeutischen Präparationen und von PALP in Bierhefeextrakt.

3.4.2.2.1. Tyrosindecaboxylase wird aus *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 isoliert, welche im Vitamin B_6 -freien Medium gezüchtet werden muß. Wird *Streptococcus faecalis* dagegen im Vitamin B_6 -haltigen Medium gezüchtet, so ist die daraus gewonnene Tyrosindecaboxylase in der Lage Tyrosin ohne Zugabe des Co-enzym abzubauen. Da der Zellauszug auch noch Pyridoxalphosphokinase enthält, wird PAL durch Zugabe von ATP zu PALP aktiviert.

Zur Bestimmung von PAL mit Tyrosindecaboxylase geben UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) 1 mg ATP zur Analyseprobe hinzu. Die Autoren stellen fest, daß bereits $1\text{ }\mu\text{g}$ ATP dazu ausreichend sein würde. Nach 18 - 20stündiger Bebrütung bei 37°C werden die Zellen ausgewaschen, in destilliertem Wasser suspendiert und im Vakuum getrocknet. Der trockene Zellextrakt ist in diesem Zustand lange Zeit haltbar. Zur Durchführung des Versuches werden im Seitenarm des Warburggefäßes 0,5 ml 0,03 m Tyrosinlösung und im Hauptteil 1 mg trocknen Zellextraktes, 1 ml 0,2 m Acetat-Puffer (pH 5,5) mit Wasser auf 3 ml aufgefüllt. Soll PAL bestimmt werden, muß noch 1 mg ATP hinzugegeben werden. Der Versuch läuft in dem Warburggefäß in zwei Schritten ab. Damit Coenzym und Apodecarboxylase das Holoenzym bilden können, werden Probelösung und Zellextrakt 10 Minuten lang bei 28°C geschüttelt. Erst dann wird zur Decarboxylierung das Tyrosin eingespritzt. Das entweichende CO_2 wird fünf mal hintereinander in Zeitabständen gemessen. In verschiedenen Messungen mit verschiedenen Mengen Coenzym wird eine Standardkurve aufgestellt, aus der man dann die unbekannte Menge PAL und PALP interpolieren kann. Nach UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) gelingt es mit dieser Versuchsanordnung PALP in der Größenordnung von $0,05\text{ }\mu\text{g}$ bis $0,5\text{ }\mu\text{g}$ mit einer Genauigkeit von $\pm 10\%$ zu bestimmen.

3.4.2.2.2. BOXER, PRUSS und GOODHART (1957), LABOUESSE, CHATAGNER und JOLLES-BERGERET (1960), WACHSTEIN, KELLNER und ORTIZ (1960), sowie MAYOR, CASCALES, MARCOS und SANTOS RUIZ (1962) haben Modifikationen zu der Methode nach UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) beschrieben.

3.4.2.2.2.1. BOXER, PRUSS und GOODHART (1957) bestimmen PALP in Blut und Leukozyten, indem sie die Versuchsanordnung nach UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) umstellen und zuerst Tyrosin mit der PALP-Lösung vermischen. Dann erst geben die Autoren Apodecarboxylase aus *Streptococcus faecalis* hinzu.

3.4.2.2.2.2. LABOUESSE, CHATAGNER und JOLLES-BERGERET (1960) bestimmen PALP in der Rattenleber und verfeinern die Be-

- stimmungsmethoden nach UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945), indem sie
- die Streptococcusstämme unter anaeroben Bedingungen züchten; dadurch erhalten sie eine "aktivere" Apotryptophanase.
 - Die Decarboxylierung läuft bei ihnen bei 31°C schneller ab, als bei 28°C.
 - Statt 1 mg ATP verwenden die Autoren 10 µg ATP, wie es ja schon UMBREIT, BELLAMY und GUNSALUS (1945) als ausreichend angesehen hatten.

3.4.2.3. Isotopenmethode

3.4.2.3.1. Die Nachteile der manometrischen Messungsmethoden werden von STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) mit den Nachteilen der manometrischen Verfahren schlechthin, als mühsam, schwierig und zeitraubend angegeben. HAMFELT (1967) bezeichnet das manometrische Verfahren darüberhinaus als zu wenig empfindlich. HAMFELT (1962, 1964, 1967) verwendet einheitlich ^{14}C -markiertes Tyrosin, MARUYAMA und COURSIN (1968), CHABNER und LIVINGSTON (1970) und SUNDARESAN und COURSIN (1970) verwenden dagegen ein ^{14}C -markiertes Tyrosin; dieses wird im ersten Fall zu ^{14}C -Tyramin und $^{14}\text{CO}_2$ enzymatisch decarboxyliert, im zweiten Fall entsteht kaltes Tyramin und $^{14}\text{CO}_2$. Mit Hilfe des markierten Tyrosin läßt sich die Empfindlichkeit, die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der PALP-Bestimmung erheblich steigern. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit haben die Autoren voneinander abweichende Verfahren entwickelt.

3.4.2.3.2. HAMFELT (1962, 1964, 1967) errechnet die Reaktionsgeschwindigkeit aus der Differenz der Strahlungsaktivität von ^{14}C -Tyrosin und ^{14}C -Tyramin, die er zu diesem Zweck papierchromatographisch auftrennen muß. Die Reaktion wird eingeleitet, indem zur Bildung von Holoenzymen die Apo- und Coenzymlösungen 30 Minuten lang bei 37°C geschüttelt werden. Daraufhin wird ^{14}C -Tyrosin hinzugegeben. Nach 5, 15 und 45 Minuten werden Lösungsproben entnommen und die Reaktionen durch kurzes Erhitzen im Wasserbad unterbrochen. Das Tyrosin-Tyramingemisch

wird in 15stündiger absteigender Papierchromatographie auf Whatman 1 mit n-Butanol, konzentrierter Essigsäure und Wasser (60:15:25) aufgetrennt. Die Menge des gebildeten ^{14}C -Tyramin wird mit einem automatischen Zähler gemessen. Die Menge des nach 5,15 und 45 Minuten gebildeten Tyramin liefert nach Linewaver und Burk die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Menge einer unbekannten PALP-Probe kann aus der Standardkurve entnommen werden.

Die Isotopenmethode nach HAMFELT (1962, 1964, 1967) läßt sich erheblich vereinfachen und beschleunigen, wenn es gelingt, die papierchromatographische Auftrennung zu umgehen. MARUYAMA und COURSIN (1968), CHABNER und LIVINGSTON (1970) und SUNDARESAN und COURSIN (1970) verwenden im Gegensatz zu HAMFELT (1962, 1964, 1967) nicht einheitlich markiertes ^{14}C -Tyrosin, sondern Tyrosin welches nur an der 1-C-Stelle markiert ist. Dieses C-Atom wird bei der Decarboxylierung abgespalten. Als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit messen MARUYAMA und COURSIN (1968) die Restintensität des 1- ^{14}C -Tyrosin nach Abgasen des $^{14}\text{CO}_2$ und CHABNER und LIVINGSTON (1970) und SUNDARESAN und COURSIN (1970) direkt die Menge des gebildeten $^{14}\text{CO}_2$.

3.4.2.3.3. MARUYAMA und COURSIN (1968) lassen Apoenzym und Coenzym auf Tyrosin 1- ^{14}C bei 37°C 20 Minuten lang einwirken, bis die Reaktion durch Denaturierung mit Trichloressigsäure unterbrochen wird. Das Reaktionsgemisch wird danach 2 Minuten lang mit N_2 durchgast, um das $^{14}\text{CO}_2$ zu entfernen. Anschließend wird die Radioaktivitätsmessung durchgeführt. Die Differenz aus Anfangsradioaktivität und Restradioaktivität nach 20 Minuten ergibt die sogenannte Decarboxylierungsrate pro 20 Minuten. Da unter den Versuchsbedingungen die Decarboxylierungsgeschwindigkeit der Menge des PALP mindestens in den ersten 30 Minuten direkt proportional ist, kommen die Autoren mit nur zwei Radioaktivitätsmessungen pro Versuch aus. Die Konzentration der unbekannten Menge des Coenzyms wird aus einer Standardkurve ermittelt.

3.4.2.3.4. CHABNER und LIVINGSTON (1970) vereinfachen die Versuchsanordnung von MARUYAMA und COURSIN (1968) und führen nur

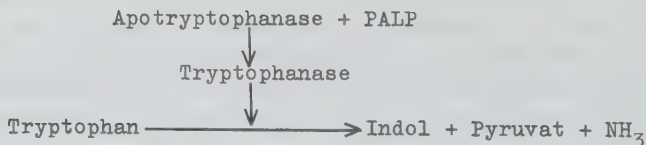
noch eine Radioaktivitätsmessung durch. Die Bildung des Holo-
 enzyms findet bei 25°C und 30 Minuten Dauer statt. Die
 Decarboxylierung des Tyrosin 1-¹⁴C erfolgt bei 32°C und wird
 nach 15 Minuten Dauer durch Denaturierung mit HCl unter-
 brochen. KOH bindet das entweichende ¹⁴CO₂ quantitativ, welches
 anschließend im Flüssigkeitsszintigraphen ausgemessen wird. Da
 die Reaktionsgeschwindigkeit unter den Versuchsbedingungen bei
 32°C mindestens 20 Minuten konstant ist, ist die ¹⁴CO₂ Ent-
 wicklung zum Zeitpunkt der Messung der PALP-Konzentration
 proportional gewesen. Mit Hilfe eines Linewaver-Burk-Diagramms
 kann die Reaktionsgeschwindigkeit sofort ermittelt werden.

3.4.2.3.5. Der Versuchsaufbau von SUNDARESAN und COURSIN (1970)
 ist dem von CHABNER und LIVINGSTON (1970) sehr ähnlich. Die
 Reaktion wird durch 10 %ige Trichloressigsäure unterbrochen;
 das ¹⁴CO₂ wird 1 Stunde lang ausgeschüttelt und in 10 ml
 Toluol-Lösung, die 0,5 % PPO (2,5 diphenyloxazol) und 0,01 %
 POPOP (p-bis-(2-(5-phenyloxazolyl))) enthält aufgefangen. Die
 Radioaktivität wird im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer ge-
 messen. Die Standardkurve ist von 1 - 8 µg PALP linear.

3.4.3. Tryptophanasemethode

3.4.3.1. Versuchsaufbau

3.4.3.1.1. WOOD, GUNSALUS und UMBREIT (1947) fanden heraus, daß
 PALP Coenzym eines Enzymkomplexes von Escherichia coli ATCC
 8739 ist, welcher Tryptophen in Indol, Pyruvat und NH₃ abbaut.



WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957), McCORMICK, GREGORY
 und SNELL (1961), DONALD und FERGUSON (1964), GAILANI (1965),
 STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) und OKUDA, FUJI
 und WADA (1970) haben mit Hilfe dieser Reaktion sehr empfind-

liche enzymatische Bestimmungsmethoden von PALP in Leukozyten, Leber und Säugergewebe entwickelt.

3.4.3.1.2. Die Verfahren der Autoren ähneln in Bezug auf Darstellung des Enzyms und der Durchführung des Versuches sehr und gehen in ihren Hauptmerkmalen auf WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) und McCORMICK, GREGORY und SNELL (1961) zurück. Bei der Messung der Reaktionsprodukte beschreiten OKUDA, FUJI und WADA (1970) einen neuen Weg. Während die anderen Autoren das gebildete Indol als Funktion der Reaktionsgeschwindigkeit nach einer Farbreaktion mit Aldehydreagenzien photometrieren, verwenden OKUDA, FUJI und WADA (1970) ^{14}C -markiertes Tryptophan. Je nach dem, ob Ring oder Seitenkette markiert sind, müssen entweder radioaktives Indol, oder Pyrúvat gemessen werden.

3.4.3.2. Colorimetrische Bestimmung

3.4.3.2.1. Bei WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) wird zur Darstellung der Tryptophanase Escherichia coli-Substanz zermörsert und abzentrifugiert. Die Apotryptophanase erhalten die Autoren aus dieser Lösung dadurch, daß bei pH 4,7 PALP aus der Lösung abdissoziiert wird. Der pH-Wert von 4,7 ist deshalb kritisch, weil das Coenzym nicht abdissoziiert wird, wenn der pH-Wert 4,7 überschreitet. Das Apoenzym wird dagegen inaktiviert, wenn der pH-Wert unter 4,7 liegt. Durch anschließende Dialyse gegen Wasser wird das Apoenzym gereinigt. Nach WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) ist der grobe Auszug zu 81,6 %, die Säurefraktion zu 95,7 % und die dialysierte Säurefraktion zu 99 % von PALP befreit. Die PALP-Messung erfolgt in mehreren Schritten: zur Bildung des Holoenzym werden Apoenzym und Analyseprobe 20 Minuten bei 37°C und pH 8,0 praeinkubiert. Anschließend wird 0,1 m Tryptophanlösung hinzugegeben und nach 5minütiger Inkubation die Reaktion durch Trichloressigsäure gestoppt. Anschließend erfolgt die Messung des gebildeten Indol. Das Reaktionslösungsgemisch wird mit Petroläther ausgeschüttelt und die Ätherphase mit Dimethylaminobenzaldehyd in HCl conc. gegeben. Die Farbintensität wird spektrophotometrisch gemessen; die unbekannte

PALP-Menge kann aus einer Standardkurve entnommen werden. WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) bestimmen PALP in Blut und Gewebe mit einem Meßbereich von 0,03 bis 0,3 µg. Sie weisen nach, daß in dem Enzym keine PAL-Kinase enthalten ist und deshalb POL, PAL und PAM auf die Bildung des Indol aus Tryptophan keinen Einfluß haben.

3.4.3.2.2. McCORMICK, GREGORY und SNELL (1961) haben mit Hilfe der Tryptophanasemethode eine Bestimmungsmethode für POLP, PALP und PAMP entwickelt. Da POLP und PAMP für Apotryptophanase keine Coenzymeigenschaft besitzen, müssen sie nach der Methode WADA und SNELL (1961) vor der eigentlichen Bestimmung durch Oxydase aus Kaninchenleber umgewandelt werden. Das Ergebnis der Umwandlung ist nicht quantitativ, so daß für jede Probe eine neue Standardkurve aufgestellt werden muß. Die PALP-Bestimmung selbst unterscheidet sich nicht bedeutend von der Methode nach WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957). Die Praeinkubation zur Holoenzymbildung und die Inkubation zum Tryptophanabbau erfolgen jeweils bei pH 8,3 10 Minuten lang. Das gebildete Indol wird in einer Toluolphase gelöst, mit Hilfe einer alkoholischen Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd und H_2SO_4 entwickelt und bei 540 nm photometriert.

3.4.3.2.3. Zur Mikrobestimmung von PALP in Leukozyten und Leber haben DONALD und FERGUSON (1964) die Methode nach McCORMICK, GREGORY und SNELL (1961) übernommen und im Verhältnis 10 : 1 verfeinert.

3.4.3.2.4. GAILANI (1965) hat den PALP-Gehalt von Leukozyten und tierischem Gewebe nach der Methode von McCORMICK, GREGORY und SNELL (1961) bestimmt. In ganz besonderer Weise hat er das Problem der PALP-Extraktionsverfahren in Gewebehomogenaten in Zusammenhang mit der Tryptophanasereaktion untersucht. GAILANI (1965) stellt den bisher üblichen Extraktionsverfahren für PALP aus biologischem Material ein eigenes Extraktionsverfahren gegenüber, mit welchem er "optimale" Ergebnisse verzeichnet.

So extrahieren z.B. WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) mit Metaphosphorsäure. Durch dieses Extraktionsverfahren verliert die PALP-Lösung mehr als 40 % ihrer ursprünglichen Aktivität, vergleicht man sie mit einer anderen Lösung, die nicht mit Metaphosphorsäure extrahiert wird.

Der saure Auszug mit 0,055 n HCl, ein gängiges Extraktionsverfahren für das Vitamin B₆ bei den mikrobiologischen Bestimmungsmethoden, ist für die enzymatische Bestimmung ungeeignet; denn je länger die Probe gekocht wird, desto weniger PALP kann nachgewiesen werden (GAILANI 1965).

Ungefähr 50 % der angenommenen Aktivität der Probelösung geht verloren, wenn die Probe mit 4 %iger Trichloressigsäure vor der Bestimmung enteiweißt wurde. Im Gegensatz dazu empfiehlt GAILANI (1965) zur PALP-Extraktion das Homogenat bei pH 4,0 10 Minuten lang zu erhitzen. Mit Hilfe dieser Methode findet der Autor 80 bis 90 % des zugesetzten PALP bei einer Genauigkeit von $\pm 10\%$ und einer Nachweisgrenze von 0,005 μg wieder.

3.4.3.2.5. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) haben eine Mikromethode zur PALP-Bestimmung ausgearbeitet, die der Methode nach McCORMICK, GREGORY und SNELL (1961) sehr ähnlich ist. Zur Farbentwicklung des Indol verwenden sie entweder p-Dimethylaminocinnamaldehyd oder p-Dimethylaminobenzaldehyd. Nach ihrer Erfahrung liefert der Cinnamaldehyd intensivere Färbung und damit empfindlichere Meßergebnisse. Die Intensität der Färbung mit Ehrlichs Reagenz nach WADA, MORISUE, SAKAMOTO und ICHIHARA (1957) und McCORMICK, GREGORY und SNELL (1961) könnte gesteigert werden, wenn es mit 16 %iger Säurelösung kombiniert wird, welche mit Äthanol versetzt ist.

3.4.3.3. Isotopenmethode

OKUDA, FUJI und WADA (1970) beschreiben eine Mikrobestimmungsmethode für PALP, bei welcher ¹⁴C-markiertes Tryptophan als Substrat der Tryptophanase dient. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Strahlungsintensität der Abbauprodukte bestimmt. Die Methode soll es ermöglichen PALP in allergeringsten Mengen zu erfassen, wie sie z.B. bei der Nadelbiopsie anfallen.

Je nach dem Markierungsort im Tryptophanmolekül erhält man Pyruvat ^{14}C oder Indol ^{14}C . Wird das Indol ^{14}C gebildet, so muß es nach der Extraktion mit Petroläther gemessen werden. Da jedoch OKUDA, FUJI und WADA (1970) Tryptophanmethylen-3- ^{14}C als Substrat verwenden, muß das gebildete Pyruvat ^{14}C mit Äthylacetat als Pyruvathydrazon extrahiert werden. Zur Durchführung der Bestimmung werden Apotryptophanase und PALP-Lösung (5-50 ng) bei 37°C 10 Minuten lang präinkubiert. Anschließend wird das radioaktive Tryptophan hinzugegeben. Die Reaktion wird nach 15 weiteren Minuten durch Denaturierung mit HCl unterbrochen. Damit das restliche ^{14}C -Tryptophan aus dem Gemisch entfernt wird, wird das Reaktionsgemisch durch eine Dowex-50-Säule (H^{+} -Form) gegeben und 3 mal mit 1 n HCl ausgewaschen. Das Eluat wird zentrifugiert und mit 2,4-Dinitrophenyl-hydrazin-Lösung versetzt. Nach 20 Minuten hat sich bei Raumtemperatur Pyruvat-hydrazon gebildet, welches mit Äthylacetat ausgewaschen wird. Die Radioaktivitätsbestimmung wird anschließend im Gasflußzähler durchgeführt. Die Autoren übernehmen unverändert die PALP-Extraktionsmethode nach ARATA und TANIOKU (1965). Hierbei wird das Gewebe mit 0,2 ml 0,3 n H_2SO_4 /mg homogenisiert, 3 Minuten lang in kochendem Wasser erhitzt und sofort wieder auf 0°C abgekühlt. Nach der Neutralisation mit K_2CO_3 wird die Lösung 5 Minuten lang bei 800 g zentrifugiert. Die Probe wird aus dem Überstand entnommen. Die Werte für wiedergefundenes PALP liegen bei dieser Methode bei 94 - 103 %.

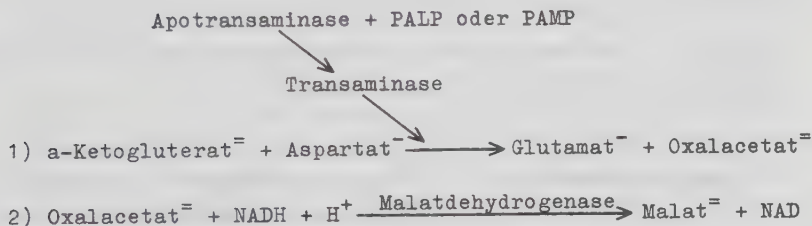
3.4.4. Transaminasemethode

3.4.4.1. Versuchsablauf

HOLZER, GERLACH, JACOBI und GNOTH (1958) verwendeten zum ersten Mal Transaminase aus Bierhefe zur Bestimmung von PALP in Bäckerhefe. SCHREIBER, ECKSTEIN, OESER und HOLZER (1964 a und b) erarbeiteten die enzymatische Bestimmungsmethode von PALP und PAMP mit Hilfe des selben Enzymas. SCHREIBER (1970) beschreibt die enzymatische Bestimmungsmethode für PALP und PAMP in einer überarbeiteten Fassung. WALSH (1966) hat für Plasma eine PALP-Bestimmungsmethode mit Hilfe von Glutamat-Aspartatapoamino-

transaminase aus Weizenkeimen ausgearbeitet.

3.4.4.1.1. Apoaminotransferase wird nach dem folgenden Schema durch das Coenzym PALP oder PAMP aktiviert. Sie transaminiert α -Ketoglutarat und Aspartat zu Glutamat und Oxalacetat.



3.4.4.1.2. Die Geschwindigkeit dieser Transaminierungsreaktion kann durch Koppelung mit der Malatdehydrogenasereaktion im optischen Test bestimmt werden. Zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der Konzentration des Coenzym besteht dann eine lineare Beziehung, wenn Malatdehydrogenase, NADH_2 , α -Ketoglutarat, Aspartat und Apoaminotransferase im Überschuß vorhanden sind. Durch Interpolation einer mit bekannten Coenzymwerten aufgestellten Standardkurve können die unter gleichen Bedingungen gefundenen Coenzymwerte ermittelt werden.

3.4.4.2. Methode nach SCHREIBER

Der Methode von SCHREIBER (1970) liegen die Arbeiten von SCHREIBER, ECKSTEIN, OESER und HOLZER (1964 a), SCHREIBER, ECKSTEIN, MAASS und HOLZER (1964) und SCHREIBER, ECKSTEIN, OESER und HOLZER (1964 b) über Anreicherung, Eigenschaften und Bestimmung von PALP und PAMP mit Apoaspartataminotransferase zu Grunde. Der Autor beschreibt die spezifische und empfindliche Bestimmung von PALP und PAMP für biochemische, nahrungsmittelchemische und medizinische Zwecke.

3.4.4.2.1. Aminotransferase aus Bierhefe muß vor der Durchführung des Versuches angereichert und durch Entfernen des

Coenzym in das Apoenzym übergeführt werden. Die Anreicherung erfolgt in sechs Schritten. Dadurch gelingt es die spezifische Aktivität des Enzyms um den Faktor 1300 zu steigern, was etwa "80 % der wahrscheinlich möglichen maximalen spezifischen Aktivität" entspricht. (SCHREIBER 1970) Die Tabelle 23 vermittelt einen Überblick über die Reinigungsschritte der Aktivitätssteigerung des Enzyms.

Tabelle 23: Anreicherung der Aminotransferase aus Bierhefe nach SCHREIBER, ECKSTEIN, OESER und HOLZER (1964 a)

Reinigungsschritt	spez. Aktivität (Akt.-Einh./mg Prot.)	Faktor
1) Macerationssaft	132	1
2) Partielle Hitzedenaturierung	192	1,5
3) Ammoniumsulfatfraktionierung	453	3,4
4) Gelfiltration (Sephadex G 100)	2620	20
5) DEAE-Cellulose	22600	170
6) Zentrifugation im Dichtegradienten (Sucrose 7 % - 13 %)	173000	1300

Die Abspaltung des Coenzym erfolgt bei der Anreicherung des Enzyms. Im fünften Schritt der Anreicherung enthält das Enzym nur noch weniger als 1 % der Coenzymaktivität.

3.4.4.2.2. Zur Darstellung des Coenzym aus tierischem Gewebe werden Organproben mit Wasser, welches 10 mMol EDTA enthält, homogenisiert, 5 Minuten lang auf 100°C erhitzt, im Wasserbad abgekühlt und zentrifugiert. Im Überstand kann PALP und PAMP bestimmt werden.

3.4.4.2.3. Zur getrennten Bestimmung von PALP und PAMP beschreibt SCHREIBER (1970) eine Differentialbestimmungsmethode. Im ersten Versuchsansatz werden PALP und PAMP bestimmt.

Im zweiten Versuchsansatz wird nur noch PAMP erfaßt, da PALP durch vorherige Reduktion mit KBH_4 zu einer enzymatisch inaktiven Substanz, wahrscheinlich POLP, hydriert wird.

3.4.4.2.4. Zur Durchführung der Bestimmung werden NADH_2 -Lösung, Maladehydrogenasesuspension, α -Ketoglutarat-Lösung, die Coenzymprobe und Apoaminotransferase in die Meßküvette pipettiert. Der pH-Wert wird auf 8,2 eingestellt und die Lösung bei 25°C vermengt.

3.4.4.2.5. Die Messung erfolgt bei 366 nm und 1 cm Schichtdicke gegen Wasser oder Luft. Hat die Extinktionsabnahme einen konstanten Wert erreicht, wird die Aspartatlösung hinzugegeben. Anschließend werden innerhalb der folgenden 5 bis 10 Minuten die Extinktionsabnahmen in 30 Sekunden-Abständen gemessen. Mit dieser Methode lassen sich nach SCHREIBER (1970) noch 10^{-4} μg PALP und PAMP mit einer Genauigkeit von 2,9 - 3,3 % bestimmen.

3.4.4.3. Methode nach WALSH

Walsh (1966) bestimmt das Plasma-PALP mit Glutamat-Aspartat-Apoaminotransaminase, die er aus Weizensamen gewinnt. Die Weizenkörner werden hierzu entfettet, getrocknet und vermahlen; das Mehl wird in H_2O suspendiert, die Suspension zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Transaminase enthält, wird mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt, der Niederschlag vom übrigen System abgetrennt und zur Aufhebung der Fällung mit Wasser gefüllt. Das Coenzym kann durch 16stündige Dialyse gegen KCl-Lösung vom Enzymkomplex abgetrennt werden.

Plasma, welches auf PALP untersucht werden soll, wird zuerst mit Trichloressigsäure enteiweißt. Der Überstand muß solange mit wassergesättigtem Äther ausgewaschen werden, bis alle Essigsäure entfernt ist. Anschließend wird die Probe untersucht.

Apo-transaminase, die Analysenprobe und die restlichen Reagenzien werden zum Versuchsansatz bei pH 7,6 und 25°C einer 1 cm Küvette inkubiert. Die optische Dichte bestimmt WALSH (1966) nach LaDUE, KARMEN und WROBLEWSKI (1954) bei 340 nm.

Die Versuchsanordnung zeigt einen brauchbaren Bestimmungs-
bereich für PALP-Konzentrationen von 0,2 - 1,5 ng.

3.4.5. Apophosphorylasemethode

HINES und LOVE (1969) beschreiben ein neues PALP-Bestimmungs-
verfahren. Sie verwenden dreifach gereinigte Apophosphorylase b
aus Kaninchenmuskel. Die Bestimmungsmethode beruht auf dem fol-
genden Reaktionsprinzip: Apophosphorylase b verbindet sich mit
PALP im molaren Verhältnis 1:2 und wird reaktiviert. Die aktive
Phosphorylase b ist in der Lage Glucose-1-P zu Glucose und in
inorganisches Phosphat abzubauen. Das freigesetzte Phosphat
ist eine Funktion der Reaktionsgeschwindigkeit und wird nach
seiner Reaktion mit saurem Ammonmolybdat photometrisch gemessen.
Darstellung und Reinigung der Apophosphorylase b wird von HINES
und LOVE (1969) nach KREBS und FISCHER (1962) und SHALTIEL,
HEDRICK und FISCHER (1966) durchgeführt. Die Autoren erhalten
eine Apoenzymkonzentration von 82 - 95 %. Da die Apoenzympräpa-
ration bei pH 6,2 und 0°C nach 14 Tagen spürbar an Aktivität
verliert, muß sie innerhalb von 12 Tagen verbraucht sein.

Zur Durchführung des Versuches werden 0,2 ml Apophosphorylase b
in 0,04 mMol Mercaptoäthanollösung und 0,1 m Malat bei pH 6,5
gelöst. Diese Lösung wird mit der gleichen Menge einer Lösung
vermengt, die 0,15 m Glucose-1-P, 2 % Glycogen, 0,002 m AMP
und 0,1 m Malat bei pH 6,5 enthält. Dieses Gemisch wird mit der
Probelösung versetzt und bei 37°C bebrütet. Nach 20 Minuten wird
die Reaktion durch Zugabe von saurem Ammonmolybdat gestoppt:
das anorganische Phosphat wird nach der Methode FISKE und
SUBBAROW (1925) photometriert.

Nach HINES und LOVE (1969) können mit dieser Bestimmungsmethode
von einem Laboranten täglich ca. 50 doppelte Analyseproben
durchgeführt werden. Die Ergebnisse ihrer Untersuchung zeigen,
daß die Phosphorylasemethode eine ausreichende Empfindlichkeit,
Spezifität und Reproduzierbarkeit zur Bestimmung von PALP in
Blut und Serum aufweist.

3.5. Die mikrobiologischen Bestimmungsmethoden

3.5.1. Allgemeines

3.5.1.1. Das Prinzip der mikrobiologischen Bestimmungsmethoden ist es, das Wachstum und den Stoffwechsel einer Kultur in Abhängigkeit von der Konzentration des essentiellen Faktors zu verfolgen. Aus diesem Grunde ist es notwendig für die Kulturen eine Nährlösung zu entwickeln, die bis auf den zu untersuchenden Faktor sämtliche Substanzen enthält, die ein optimales Wachstum ermöglichen. Wird dann der Faktor, dessen Fehlen die Lebenserscheinungen des Organismus hemmt, der Lösung zugesetzt, so reagiert die Kultur in bestimmten Grenzen proportional zu der zugesetzten Menge des Wachsfaktors.

3.5.1.1.1. Die Wachstumsreaktionen können sowohl direkt, als auch indirekt gemessen werden. Direkte Meßmethoden sind Trübungsmessung, Trockengewichtsbestimmung, Eiweißbestimmung oder Zählung der Zellen; indirekte Meßmethoden sind die Messungen der Stoffwechselprodukte, CO_2 und Milchsäure. Für die Vitamin B_6 -Bestimmung werden in unserem Fall ausschließlich direkte Meßverfahren angewandt.

3.5.1.1.2. HAENEL (1960) diskutiert den mikrobiologischen Vitamin-Nachweis und stellt die Vorzüge seinen Nachteilen gegenüber. Nachteile des mikrobiologischen Nachweises sind im Vergleich zu chemischen und physikalischen Methoden

- der große Zeit- und Arbeitsaufwand. Mikrobiologische Bestimmungsverfahren sind meist umständlich und zeitraubend und sind für Routineuntersuchungen weniger geeignet.

- Die Spezifität des Mikroorganismus kann sich für ein bestimmtes Vitamin erheblich von der höherer Lebewesen unterscheiden. Streng spezifische Faktoren können bei Mikroorganismen teilweise nur unspezifisch zur Geltung kommen. (HAENEL 1960) Vorstufen oder Vitaminderivate führen mitunter zu unerwarteten Ergebnissen.

- Bei mikrobiologischen Analysen müssen im Ergebnis Streuungen bis zu 15 % wegen der "biologischen Variabilität" in Kauf genommen werden (GYÖRGY 1951 a); daß diese Streuung nicht unbedingt eintreten muß, zeigt GYÖRGY (1951 a)

am Beispiel eines Riboflavinnachweises, der einen Fehlerbereich von nur 0,7 - 1,2 % aufweist.

Vorteile für die mikrobiologische Bestimmung ergeben sich nach HAENEL (1960) überall dort, wo die Struktur des Vitamins keine eindeutige chemische oder physikalische Bestimmung zuläßt und es

- auf den Nachweis noch geringster Mengen ankommt. Die Nachweisgrenze für Vitamin B₆ liegt immerhin zwischen 1 ng-10⁻³ ng und ist damit der Empfindlichkeit enzymatischer Methoden vergleichbar.
- Während enzymatische Methoden nur PALP und PAMP erfassen, können mit mikrobiologischen Methoden POL, PAL und PAM, aber auch das Gesamt-Vitamin B₆ erfaßt werden.

3.5.1.2. Da das Fermentspektrum der Mikroorganismen nicht ausreicht, gebundene Vitamine verwertbar zu machen, ist der hydrolytische Aufschluß der Probe vor der Bestimmung unerlässlich. Chromatographische Auftrennungsverfahren müssen gegebenenfalls der Hydrolyse folgen.

3.5.1.2.1. Die Freisetzung der gebundenen Vitamine ist ein Hauptproblem der Mikrobialanalytik (HAENEL 1960). Als alleiniges Kriterium für die erfolgreiche Extraktion sehen STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) die Methode an, mit welcher die höchsten Werte für Vitamin B₆ erzielt werden. Dieses hatte seine Berechtigung bei physikalischen, chemischen und enzymatischen Vitamin B₆-Bestimmungsverfahren, die das Vitamin auf Grund ihrer physikalischen und chemischen Struktur oder ihrer Spezifität für eine bestimmte enzymatische Reaktion maßen. Schwieriger wird die Beurteilung hydrolytischer Techniken, wenn das freigesetzte Vitamin mikrobiologisch bestimmt werden soll. HAENEL (1960) diskutiert für Mikroorganismen nicht nur die bereits erwähnte "mangelnde Spezifität", sondern auch "fördernde und hemmende Einflüsse", die durch unkontrollierbare Extraktbestandteile des Hydrolysats entstehen können.

3.5.1.2.1.1. Als Beispiel eines hemmenden Einflusses kann die antagonistische Wirkung von Thiamin und Vitamin B₆ bei *Saccharomyces carlsbergiensis* angeführt werden. Thiamin ist Antimetabolit von Vitamin B₆, während Vitamin B₆ die Biosynthese von Thiamin bei *Saccharomyces carlsbergiensis* hemmt (LEWIN und BROWN 1963).

3.5.1.2.1.2. Als Beispiel eines fördernden Einflusses kann die synergistische Wirkung von DL-Alanin und D-Alanin bei *Streptococcus faecalis* und *Streptococcus faecium* angesehen werden, welches allerdings in erheblich höherer Konzentration PAL und PAM als Wachstumsfaktoren zu ersetzen vermag.

3.5.1.2.2. Die chromatographische Auftrennung des Hydrolysates wird bei der mikrobiologischen Bestimmung weniger zur Eliminierung störender Hydrolyseprodukte, als vielmehr zur Auftrennung des Vitamin B₆ in die einzelnen Abkömmlinge POL, PAL und PAM angewandt.

3.5.1.2.2.1. TOEPFER, Mac ARTHUR und LEHMANN (1960), TOEPFER und LEHMANN (1961), PARDINI und ARGOUEDELIS (1968), POLANSKY (1969) und BRIN (1970) beschreiben Vitamin B₆-Bestimmungsverfahren, die mit *Saccharomyces carlsbergiensis* durchgeführt werden. *Saccharomyces carlsbergiensis* gilt als idealer Mikroorganismus zur Vitamin B₆-Gesamtbestimmung, da sein Wachstum durch POL, PAL und PAM in gleicher Weise beeinflusst wird. Trennt man das Hydrolysat in die einzelnen B₆-Abkömmlinge auf, so kann mit *Saccharomyces carlsbergiensis* POL, PAL und PAM einzeln bestimmt werden. Die Eliminierung störender Beiprodukte ist ein Nebenergebnis der chromatographischen Auftrennung.

3.5.1.2.2.2. Eine zweite Autorengruppe beschreibt den sogenannten Differentialnachweis für Vitamin B₆. Hierbei wird bewußt auf die Anwendung der chromatographischen Auftrennung verzichtet, da das Prinzip dieser Differentialnachweise auf der selektiven Empfindlichkeit bestimmter Mikroorganismen für

Gesamt-Vitamin B₆, PAL und PAM und POL beruht. Aus der Differenz der erhaltenen Werte werden die einzelnen Vitamin B₆-Bestandteile errechnet. Bei der Durchführung dieser Differentialbestimmungsmethoden müssen bewußt zwei Nachteile in Kauf genommen werden. Es sind erstens die Anfälligkeit gegen unkontrollierbare Hydrolysebestandteile und die daraus resultierenden Fehlerstreuungen. Mac ARTHUR POLANSKY, MURPHY und TOEPFFER (1964) und POLANSKY (1969) erhalten um 5 - 20 % abweichende Ergebnisse, wenn sie mit *Saccharomyces carlsbergiensis* unchromatographierte und chromatographierte Hydrolysate auf Gesamt-Vitamin B₆ hin vergleichen. Diese Streubreite erhöht sich zwangsläufig, wenn die Bestimmung nicht mit einem, sondern mit drei verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt wird. Zweitens eignet sich die Differentialbestimmungsmethode nicht zur Vitamin B₆-Bestimmung in Hydrolysaten, die hohe Werte an L-Alanin, DL-Alanin und deren Peptide enthalten (HASKELL und SNELL 1970). Dies ist in besonderer Weise bei Bluthydrolysaten und enzymatischen Caseinhydrolysaten der Fall. Nach STORVICK und McLEOD PETERS (1964) erhält man für *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium* und *Streptococcus faecalis* im Bluthydrolysat 20 - 50 mal höhere Werte, als für *Saccharomyces carlsbergiensis*.

3.5.1.3. Der Versuchsablauf der Vitamin B₆-Bestimmung mit Mikroorganismen gliedert sich in

- Wahl des Teststammes
- Vorbereitung der Testsubstanz
- Durchführung der Bestimmung
- Messung und Auswertung der Ergebnisse

3.5.1.3.1. Die Durchführung der Vitamin B₆-Bestimmung erfolgt mit Mikroorganismen, für welche wenigstens ein Abkömmling des Vitamin B₆ ein essentieller Faktor ist. Es sind Bakterien, Hefen, Schimmelpilze und Ciliaten. Für die Wahl des Teststammes ist das Nachweisziel entscheidend. Während z.B. *Saccharomyces carlsbergiensis* Gesamt-Vitamin B₆ nachweist, ist *Lactobacillus casei* lediglich für PAL empfindlich. Die Tabelle 24 vermittelt einen Überblick über die verwendeten

Mikroorganismen und jene Abkömmlinge der Vitamin B₆-Gruppe, für welche sie Wachstumsreaktionen zeigen.

Tabelle 24: Empfindlichkeit der Reststämme für die verschiedenen Vitamin B₆-Derivate

Stamm	Vitamin B ₆ gesamt	PAL	PAM
Streptococcus faecalis R ATCC 8043		+	+
Streptococcus faecium Ø 51		+	+
Lactobacillus casei ATCC 7469		+	
Escherichia coli Mutante 154-59 L	+		
Saccharomyces carlsbergensis 4238 ATCC 9080	+		
Saccharomyces cerevisiae GM ATCC 7752	+		
Saccharomyces oviformis 782	+		
Kloeckera brevis	+		
Neurospora sitophila Mutante 299 ATCC 9276	+		
Tetrahymena pyriformis	+		

Aus der Übersicht geht hervor, daß Mikroorganismen für PAL und PAM und PAL und Gesamt-Vitamin B₆ aber nicht für POL empfindlich sind. Deshalb haben sich zur Einzelbestimmung für POL, PAL und PAM im Wesentlichen zwei Methoden herauskristallisiert: die Differentialbestimmungsmethode, bei welcher mit Hilfe von drei verschiedenen Mikroorganismen ein unchromatographiertes Hydrolysat untersucht wird und die Methode nach TOEPFER und LEHMANN (1961), bei welcher mit Saccharomyces carlsbergensis

das chromatographierte Hydrolysat untersucht wird. Die folgende Übersicht (Tabelle 25) zeigt eine Zusammenfassung der Methoden zur Einzelbestimmung von POL, PAL und PAM.

Tabelle 25: Verwendung der Teststämme zum Nachweis der Vitamin B₆-Derivate durch verschiedene Autoren

Autor	Vitamin B ₆ -gesamt	PAL	PAL + PAM
RABINOWITZ und SNELL (1948)	Saccharomyces carlsbergiensis	Lactobacillus casei	Saccharomyces faecalis
GREGORY (1959)	Saccharomyces carlsbergiensis	Lactobacillus casei	Saccharomyces faecium
MÜCKE (1957)	Neurospora sitophila	Lactobacillus casei	Saccharomyces faecalis
HASKELL und SNELL (1970)	Saccharomyces carlsbergiensis	Lactobacillus casei	Saccharomyces faecium
TOEPFER und LEHMANN (1961)	Saccharomyces carlsbergiensis		
BRIN (1970)	Saccharomyces carlsbergiensis		

3.5.1.3.2. Die Teststämme müssen für den Versuch sorgfältig vorbereitet werden. Sie werden auf Kultur Nährmedien gehalten, welche die für den Organismus notwendigen Nährstoffe enthalten müssen. Je nach Autor müssen die Stämme alle 8 bis 28 Tage auf neue Nährböden überimpft, der Stamm 20 Stunden bis 3 Tage bei 20 - 38°C überbrütet und schließlich bei +4°C in Ruhephase belassen werden. Zur Bestimmung des Vitamins werden frische Ansätze von Teststämmen aus ihren Nährböden ausgewaschen, durch Zentrifugieren eingengt, um anschließend zu einer Impflösung mit definierter Konzentration (Zellen/ μ l) im Nephelometer gebracht zu werden. Diese so erhaltene Endlösung muß mit dem Testnährmedium versetzt werden. KNOBLOCH (1963) stellt für die Wahl und Modifizierung der Nährlösung zwei Grundsätze auf: - das Substrat muß in allen Einzelheiten qualitativ und quantitativ bekannt sein und es muß

-gewährleistet sein, daß sich das Milieu während der Bestimmung nicht verändern kann.

Kulturnährmedium und Testnährmedium unterscheiden sich darin, daß das Testnährmedium primär kein Vitamin B₆ enthält und daß es speziell im Bakterientest oft doppelt konzentriert ist. HASKELL und SNELL (1970) haben für *Saccharomyces carlsbergiensis*, *Lactobacillus casei* und *Sacchyromyces faecium* Testnährmedien zusammengestellt (Tabelle 26).

3.5.1.3.3. Erst nach Zugabe der bekannten oder unbekannten Vitamin B₆-Menge kann der Wachstumstest durch Bebrütung durchgeführt werden. Je nachdem, ob der Test auf einer Agar-Platte, oder in einem Gefäß durchgeführt wird, unterscheiden wir den Platten- oder den Verdünnungstest.

3.5.1.3.4. Nach der Bebrütung erfolgen Messung und Auswertung der Ergebnisse. Im "Verdünnungsverfahren" wird das Wachstum der Keime sowohl gravimetrisch, als auch turbidimetrisch gemessen.

3.5.1.3.4.1. Der Neurosporatest nach STOKES, LARSEN, WOODWARD und FORSTER (1943) wird als einziger Test gravimetrisch ausgewertet. Hierzu werden die Pilzmycelien nach der Bebrütung eingengt, zwei Stunden bei 100°C getrocknet und dann gewogen. Die turbidimetrische Messung ist der Regelfall für die Methoden der Verdünnungstestverfahren. Nach der Bebrütung wird der Grad der Trübung in einer Küvette je nach Autor bei 640, 650 oder 660 nm spektrophotometrisch gemessen.

3.5.1.3.4.2. JONES und MORRIS (1950), sowie HAENEL und MÜLLER-BEUTHOW (1956) beschreiben den Plattentest mit *Saccharomyces carlsbergiensis* und *Neurospora sitophila*. Das Wachstum wird in beiden Fällen geometrisch gemessen, in dem der Mittelwert der Durchmesser bestimmt und gegen den Logarithmus der Standardkonzentrationen aufgetragen wird. Die Empfindlichkeit der Plattentestverfahren liegt dabei um mindestens eine 10er Potenz unter der der Verdünnungsverfahren.

Tabelle 26: Beispiel für Nährmedien für Teststämme der mikrobiologischen Vitamin B₆-Bestimmung nach HASKELL und SNELL (1970)

Substanz	Menge pro Liter doppelt starker Nährlösungen für:		
	Saccharomyces carlsbergiensis	Lactobacillus casei	Streptococcus faecium
Glucose (g)	100	20	20
Ammoniumsulfat (g)	3,75	-	-
Vitaminfreie Aminosäuren (g)	5	15	10
DL-Alanin (g)	-	-	1
L-Asparagin (mg)	-	200	200
L-Cystin (mg)	-	400	800
Glycin (mg)	-	400	400
L-Prolin (mg)	-	-	20
L-Phenylalanin (mg)	-	-	20
L-Histidin (mg)	-	-	20
L-Tyrosin (mg)	-	-	20
DL-Tryptophan (mg)	-	200	200
Calciumchlorid (mg)	250	-	-
Zitronensäure (mg)	2	-	-
Eisensulfat (mg)	-	20	20
Eisenchlorid (mg)	5	-	-

Substanz	Menge pro Liter doppelt starker Nährlösungen für:		
	Saccharomyces carlsbergiensis	Lactobacillus casei	Streptococcus faecium
Magnesiumsulfat (mg)	250	400	400
Mangansulfat (mg)	5	20	20
Kaliumchlorid (mg)	850	-	-
Kaliumphosphat, einbasisch (g)	1,1	1	6
Kaliumphosphat, zweibasisch (g)	-	1	6
Natriumacetat, wasserfrei (g)	-	12	-
Natriumchlorid (mg)	-	20	20
Natriumcitrat (g)	10	-	40
p-Aminobenzoesäure (µg)	-	400	400
Biotin (µg)	66	4	4
Calciumpentothemat (µg)	500	800	800
Folsäure (µg)	-	20	800
Inositol (mg)	50	-	-
Nicotinsäure (µg)	500	800	800
Riboflavin (µg)	-	800	800
Thiamin (µg)	500	400	400
Adeninsulfat (mg)	-	-	10
Guanin (mg)	-	-	10
Uracil (mg)	-	-	10
Tween 80 (ml)	-	-	2
pH-Wert	4,7	6,8	6,8

3.5.2. Bestimmung mit Bakterien

3.5.2.1. Test mit Streptococcus faecalis

RABINOWITZ und SNELL (1947 a und b) haben ein Vitamin B₆-Bestimmungsverfahren mit dem Mikroorganismus Streptococcus faecalis R ATCC 8043 entwickelt. Dieses Verfahren wird von GYÖRGY (1951 a), MÜCKE (1957), STROHECKER und HENNING (1963) und FRAGNER (1964/65) übernommen und diskutiert.

3.5.2.1.1. Streptococcus faecalis eignet sich für den Gesamtnachweis von PAL und PAM. Auf Grund dieser Eigenschaft ergibt sich die Indikation zu diesem Testorganismus.

-PAM kann nach GYÖRGY (1951 b) gemessen werden, wenn PAL nach der Methode SNELL (1945) mit Aceton und Alkali vor der Bestimmung zerstört wird.

-PAM und PAL können bestimmt werden, wenn der Versuch mit Lactobacillus casei ergänzt wird. Da Lactobacillus casei ausschließlich für PAL empfindlich ist, erhält man aus der Differenz beider Messungen die Einzelwerte für PAL und PAM.

-In gleicher Weise dient Streptococcus faecalis zur Bestimmung von PAL und PAM bei der Differentialbestimmungsmethode für Vitamin B₆ nach RABINOWITZ und SNELL (1948) und MÜCKE (1957). Bei diesen können über die Gesamt-Vitamin B₆-Bestimmung mit Saccharomyces carlsbergiensis oder Neurospora sitophila, der Summe von PAL und PAM mit Streptococcus faecalis und dem Einzelwert von PAL mit Lactobacillus casei die Werte für PAL, PAL und PAM bestimmt werden.

3.5.2.1.2. Der Meßbereich des Streptococcus faecalis Tests liegt nach MÜCKE (1957) zwischen 0 - 0,06 µg%. Er ist damit der Empfindlichkeit enzymatischer Methoden vergleichbar.

3.5.2.1.3. Zur Stammhaltung wird ein Kulturnährmedium aus 1 % Hefeextrakt, 1 % Glucose und 1,5 % Agar mit Streptococcus faecalis beimpft, bei 37°C 24 - 28 Stunden lang bebrütet und anschließend bei 4°C zur Überimpfung aufbewahrt.

Zur Gewinnung der Impflösung werden 10 ml Testmedium nach der Beimpfung 20 - 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Die Mikroorganismen

werden abzentrifugiert, gewaschen und in 10 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert. Die Vitamin B₆-Bestimmung wird so durchgeführt, daß ein Tropfen Impflösung in einer doppelt starken Testnährlösung zusammen mit der Probe bebrütet werden. Das Wachstum kann bei 660 nm turbidimetrisch bestimmt werden. Die Menge der unbekannten Vitaminmenge wird aus einer unter Standardbedingungen aufgestellten Eichkurve interpoliert.

3.5.2.1.4. Als entscheidenden Nachteil von *Streptococcus faecalis* zur PAL- und PAM-Bestimmung führen STORVICK und McLEOD PETERS (1964) und STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964), MÜCKE (1957) und STROHECKER und HENNING (1963) die Tatsache an, daß DL-Alanin und D-Alanin zu PAL und PAM synergistische Wirkung haben und das Vitamin als Wachstumsfaktor ersetzen können. GREGORY (1959), STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) und HASKELL und SNELL (1970) modifizieren aus diesen Gründen den Differentialnachweis für Vitamin B₆, in dem sie *Streptococcus faecalis* durch *Streptococcus faecium* Ø 51 Gebrüder Meier ersetzen.

3.5.2.2. Test mit *Streptococcus faecium*

3.5.2.2.1. Zwar ist die Verwendung von *Streptococcus faecium* gegenüber *Streptococcus faecalis* dadurch überlegen, daß sie gegen DL- und D-Alanin 10 - 20 mal weniger empfindlich sind, doch hat *Streptococcus faecium* durchaus seine eigene Problematik. Nach STORVICK und McLEOD PETERS (1964) ersetzt D-Alanin PAL und PAM zwar nicht, doch stimuliert es zusammen mit B₆ das Wachstum dieses Mikroorganismus. Dieser Effekt wird nach STORVICK und McLEOD PETERS (1964), STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) und GREGORY (1959) dadurch ausgeglichen, daß 0,5 g DL-Alanin/l Nährlösung hinzugegeben werden.

3.5.2.2.2. RAINES und HASKELL (1968) zeigen dagegen, daß *Streptococcus faecium* auch ohne Vitamin B₆-Zufuhr wachsen kann. Sie belegen an Hand von Untersuchungen, daß *Streptococcus faecium* in der Lage ist, Vitamin B₆ durch D-Alanin, L-Alanin, synthetische Alaninpeptide und alaninreiche Kaseinhydrolysate zu ersetzen. Um weiter die Möglichkeit zu

untersuchen, ob Alaninpeptide *Streptococcus faecium* zu schnellem Wachstum anregen, wurden 4 synthetische Alaninpeptide auf ihre Wirkung auf *Streptococcus faecium* bei absolutem Vitamin B₆-Mangel hin untersucht. L-Alanylglycin war dabei am wirkungsvollsten. 500 µg/ml Kulturmedium L-Alanylglycin entsprachen 18 ng/ml Vitamin B₆ an Wachstumswirkung auf *Streptococcus faecium*.

Die Autoren untersuchten ferner, ob der Wachstumseffekt der Peptide und Alanin durch die Gabe von 4 mg/ml DL-Alanin in der Kulturnährlösung unterbunden werden kann. "In einer so ergänzten Nährlösung wuchsen die Zellen in 8 Stunden zu einer optischen Dichte von 0,7 heran, gleich ob der Lösung 1,0, 0,5 oder 0 ng/ml PAL zugesetzt worden war" (RAINES und HASKELL 1968).

3.5.2.2.3. HASKELL und SNELL (1970) verwenden *Streptococcus faecium* zur Bestimmung von PAL und PAM und schränken dabei ein, daß diese Bestimmungsmethode sich nicht für Bluthydrolysate und enzymatische Kaseinhydrolysate eignet, weil diese einen hohen DL-Alanin Gehalt haben. Die *Streptococcus faecium* Ø 51-Kulturen werden auf einem Kulturmedium aus 1 % Hefeextrakt, 0,25 % Glucose und 2 % Agar gehalten. Monatlich werden die Kulturen überimpft, bei 37°C 24 Stunden lang bebrütet und bei 4°C aufbewahrt.

Die Impflösung wird durch Bebrütung einer einfach konzentrierten Nährlösung (siehe Tabelle 26) mit *Streptococcus faecium* gewonnen. Die Zellen werden abzentrifugiert, gewaschen und mit 0,9 % NaCl zu einer optischen Dichte von 0,3 bei 650 nm verdünnt.

1 ml dieser Zellsuspension, 100 ml Nährlösung doppelter Konzentration und die Pyridoxinprobe werden 22 - 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Anschließend wird die Trübung bei 650 nm als Maß für die Konzentration von PAL und PAM bestimmt.

3.5.2.3. Test mit *Lactobacillus casei*

RABINOWITZ, MONDY und SNELL (1948) haben für PAL eine Testmethode mit *Lactobacillus casei* ATCC 7469 ausgearbeitet,

welche in modifizierter Form von MÜCKE (1957), STROHECKER und HENNING (1963), STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) und HASKELL und SNELL (1970) übernommen wurde.

3.5.2.3.1. Im Gegensatz zu *Streptococcus faecium* wird *Lactobacillus casei* ausschließlich durch PAL zu Wachstum angeregt. Auf Grund dieser speziellen Empfindlichkeit wurde es 1948 RABINOWITZ zum ersten Mal möglich, die Bestandteile der Vitamin B₆-Gruppe individuell nachzuweisen. Die Verwendung von *Lactobacillus casei* für die Bestimmung von PAL bei der Vitamin B₆-Differentialbestimmungsmethode ist die Methode der Wahl und wurde auch bisher von sämtlichen Autoren übernommen. *Lactobacillus casei* hat einen Meßbereich für PAL von 0 - 0,4 µg%.

3.5.2.3.2. Vergleichbar mit *Streptococcus faecium* sind D-Alanin und seine Peptide auch für *Lactobacillus casei* Störfaktoren, wenn diese Substanzen in hoher Konzentration vorkommen. Etwa 10.000 - 25.000 µg sind erforderlich um 1 µg PAL für *Lactobacillus casei* zu ersetzen (HASKELL und SNELL 1970). Da D-Alanin außer im Bluthydrolysat in biologischem Material selten ist, ist die Möglichkeit der Störung des mikrobiologischen Test bei der PAL-Bestimmung allerdings gering.

3.5.2.3.3. HASKELL und SNELL (1970) haben den Test mit *Lactobacillus casei* ATCC 7469 nach RABINOWITZ, MONDY und SNELL (1948) beschrieben. Die Stammhaltung und die Überimpfung des Teststammes entspricht genau der Stammhaltung von *Streptococcus faecium*. Zur Darstellung der Impflösung wird *Lactobacillus casei* 24 Stunden bei 37°C in einer Nährlösung einfacher Konzentration bebrütet (siehe Tabelle 26), anschließend wie *Streptococcus faecium* abzentrifugiert, gewaschen und verdünnt. In gleicher Weise wie für *Streptococcus faecium* erfolgt mit *Lactobacillus casei* die Bestimmung von PAL! Messung und Auswertung erfolgt lediglich mit dem Unterschied, daß die Bebrütung nicht bei 30 sondern bei 37°C, 22 - 24 Stunden lang erfolgt.

3.5.2.4. Test mit Escherichia coli

3.5.2.4.1. DIDING und MELANDER (1955) empfehlen *Escherichia coli* 154-59 L zur Vitamin B₆-Gesamtbestimmung in Multivitaminpräparaten. Die Verwendung dieses Testorganismus für die Vitaminbestimmung in biologischem Material wird dadurch erschwert, daß die Wachstumsreaktion durch Aminosäuren aus Caseinhydrolysat verändert wird. Andererseits hat der Test mit *Escherichia coli* den Vorteil, daß nicht unter absolut sterilen Vorkehrungen gearbeitet werden muß, da die Nährlösung ohnehin schon so beschaffen ist, daß die Mehrzahl anderer Keime nicht anwachsen können.

3.5.2.4.2. Die Stammhaltung wird auf Schräg-Agar durchgeführt, eine Überimpfung findet monatlich statt. Um die Impfkulturen herzustellen, wird *Escherichia coli* in der Nährlösung 20 Stunden bei 37°C bebrütet, abzentrifugiert, zweimal gewaschen und im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zur Durchführung der Bestimmung wird ein Tropfen Impflösung mit Nährlösung und Testmaterial auf 2 ml ergänzt und 20 Stunden bei 37°C bebrütet. Die Wachstumsreaktion wird turbidimetrisch gemessen. Bei der Auswertung des Ergebnisses ist zu berücksichtigen, daß *Escherichia coli* 10 - 20 mal mehr PAM, als PAL oder POL benötigt. Der brauchbare Meßbereich für POL und PAL liegt bei 2 - 20 ng/ml und für PAM bei 40 - 200 ng/ml.

3.5.3. Bestimmung mit Hefen

Mikrobiologische Vitamin B₆-Bestimmungsverfahren sind für die Hefestämme *Saccharomyces carlsbergiensis*, *Saccharomyces cerevesiae*, *Saccharomyces oviformis* und *Kloeckera brevis* entwickelt worden. Das Bestimmungsverfahren mit *Saccharomyces carlsbergiensis* ist von ihnen am bedeutendsten.

3.5.3.1. Test mit Saccharomyces carlsbergiensis

3.5.3.1.1. ATKIN, SCHULZ, WILLIAMS und FREY entwickelten 1943 mit *Saccharomyces carlsbergiensis* ein mikrobiologisches Vitamin B₆-Bestimmungsverfahren, welches in der Folgezeit zum Vitamin B₆-Standardtest vervollkommen wurde. MÜCKE (1957),

PARRISH, LOY und KLINE (1955), MORRIS, HUGHES und MULDER (1959) und eine große Anzahl anderer Autoren haben diesen Test modifiziert und verbessert. RABINOWITZ und SNELL (1948), STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964), STROHECKER und HENNING (1963) und HASKELL und SNELL (1970) verwenden den *Saccharomyces carlsbergiensis* Test zur Vitamin B₆-Gesamtbestimmung im Rahmen ihrer Vitamindifferentialbestimmungsmethoden. TOEPFER, Mac ARTHUR und LEHMANN (1960), TOEPFER und LEHMANN (1961), Mac ARTHUR POLANSKY, MURPHY und TOEPFER (1964), POLANSKY (1969) und BRIN (1970) verwenden ihn zur Einzelbestimmung der chromatographisch aufgetrennten Vitamin B₆-Komponenten. Als Besonderheit beschreibt TSUJI (1966) ein Verfahren, bei welchem die *Saccharomyces carlsbergiensis*-Stämme mit flüssigem Stickstoff eingefroren werden, so daß nach dem Auftauen ein Testorganismus zur Verfügung steht.

3.5.3.1.1.1. Nach PARRISH, LOY und KLINE (1955) hat die Wahl von *Saccharomyces carlsbergiensis* als Teststamm seit ihrer Veröffentlichung keine negative Beurteilung erfahren. *Saccharomyces carlsbergiensis* ATCC 9080 ist für POL, PAL und PAM etwa gleich empfindlich. Die Wachstumsreaktion von PAL zu POL verhält sich etwa wie 0,8 - 1,3 : 1, die von PAM zu POL etwa wie 0,9 - 1,4 : 1. Nach MORRIS, HUGHES und MULDER (1959) zeigt *Saccharomyces carlsbergiensis* für PAL und POL gleiche, für PAM "manchmal 10 - 30 % geringere Aktivität".

3.5.3.1.1.2. Der Meßbereich für Gesamt-Vitamin B₆ liegt nach MÜCKE (1957) bei 0 bis 0,4 µg%. Nach HASKELL und SNELL (1970) erhält man im Bereich von 0 - 1 ng/ml eine regelmäßige Standardkurve. Zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Proben streuen im Bereich um 2 %.

3.5.3.1.1.3. DL- und L-Alanin und seine Peptide stören den *Saccharomyces carlsbergiensis*-Test nicht. Aus diesem Grund wird der *Saccharomyces carlsbergiensis*-Test als Gegenprobe zu den Bakterientestverfahren mit *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* und *Lactobacillus casei* sowie *Escherichia coli* empfohlen.

STORVICK und McLEOD PETERS (1964) weisen auf die Thiamin-empfindlichkeit, HASKELL und SNELL (1970) auf die Empfindlichkeit des Teststammes gegenüber hohen Salzkonzentrationen hin. Bei Thiaminmangel synthetisiert *Saccharomyces carlsbergiensis* sowohl Thiamin als auch Vitamin B₆. Hohe Salzkonzentrationen, wie sie bei Ionenaustauschchromatogrammen auftreten können, schränken das Wachstum von *Saccharomyces carlsbergiensis* ein.

3.5.3.1.1.4. Vitamin B₆-Bestimmungen wurden mit *Saccharomyces carlsbergiensis* in großer Anzahl mit den verschiedensten Proben durchgeführt. Dies sind Blut, Leber, Niere, Hirn und Herz, Früchte, verschiedene Gemüsesorten, Samen- und Getreideprodukte. Diese Bestimmungen wurden sowohl im Verdünnungstest- als auch im Plattentestverfahren durchgeführt.

3.5.3.1.2. HASKELL und SNELL (1970) beschreiben ein Testverfahren mit *Saccharomyces carlsbergiensis* zur Gesamt-Vitamin B₆-Bestimmung. Zur Stammhaltung der Kulturen werden Böden, die 2,5 % Agar und 10 % Malzextrakt enthalten, monatlich überimpft und bei 4°C aufbewahrt. Zur Herstellung der Impflösung werden 10 ml Nährlösung einfacher Konzentration (siehe Tabelle 26) mit *Saccharomyces carlsbergiensis* beimpft und 18 bis 24 Stunden bei 30°C bebrütet. Die Kulturen werden abzentrifugiert und so verdünnt, daß sie 0,04 mg Trockengewicht/ml Lösung aufweisen. Diese Konzentration entspricht einer optischen Dichte von 0,08 bei 650 nm. Die Impflösung kann bei 4°C etwa 1 Woche gelagert werden.

Zur Bestimmung werden 5 ml Nährlösung doppelter Konzentration mit der auf 5 ml verdünnten Probe und einem Tropfen Impflösung bei 30°C etwa 24 Stunden bebrütet. Die Trübung wird bei 650 nm gegen Wasser gemessen.

3.5.3.2. Test mit *Saccharomyces oviformis* und *Saccharomyces cerevesiae*

3.5.2.2.1. SIEGEL, MELNICK und OSER haben 1943 mit dem Testorganismus *Saccharomyces cerevesiae* ATCC 7752 und BURKHOLDER (1943) mit dem Testorganismus *Saccharomyces oviformis* 782

mikrobiologische Bestimmungsverfahren für Vitamin B₆ ausgearbeitet.

Mit *Saccharomyces oviformis* läßt sich nach BURKHOLDER (1943) Vitamin B₆ in einem Meßbereich von 0 - 8 ng bestimmen. Die Bestimmung nach BURKHOLDER hat den entscheidenden Nachteil, daß *Saccharomyces oviformis* PAM und PAL mit 20 - 80 % geringeren Aktivitäten mißt als POL. Die Methode nach BURKHOLDER (1943) hat in der Literatur der Vitamin B₆-Bestimmung keinerlei Beachtung finden können.

3.5.3.2.2. In einer Gesamtübersicht empfiehlt GYÖRGY (1951 b) dagegen die Methode nach SIEGEL, MELNICK und OSER (1943) mit *Saccharomyces cerevesiae* als Teststamm. *Saccharomyces cerevesiae* eignet sich nach GYÖRGY (1951 b) für die Vitamin B₆-Gesamtbestimmung, weil der Teststamm für die einzelnen Vitamin B₆-Abkömmlinge POL, PAL und PAM eine dem tierischen Organismus vergleichbare Aktivität zeigt. Denn PAM und PAL haben unter den Versuchsbedingungen nur 40 - 46 % der Aktivität von POL. Damit könnte nach GYÖRGY (1951 b) besser der wirkliche Vitamin B₆-Bedarf für Tier und Mensch untersucht werden, als dies mit der Methode nach ATKIN, WILLIAMS, SCHULZ und FREY (1943) der Fall wäre. Der Meßbereich für *Saccharomyces cerevesiae* beträgt 0,2 ng/ml. Auch diese Bestimmungsmethode konnte sich in der Folgezeit als Vitamin B₆-Testverfahren nicht durchsetzen.

3.5.3.3. Test mit *Kloeckera brevis*

3.5.3.3.1. BARTON-WRIGHT (1967) und KOZELUHOVA (1969) machen auf einen neuen Hefestamm zur Vitamin B₆-Bestimmung, *Kloeckera brevis*, aufmerksam. BARTON-WRIGHT (1967) bestimmt mit *Kloeckera brevis* den Gesamt-Vitamin B₆-Gehalt in Futtermitteln, während KOZELUHOVA (1969) die Methode nach BARTON-WRIGHT modifiziert.

3.5.3.3.2. Die Beschreibung der Durchführung des Versuches erfolgt nach KOZELUHOVA (1969). Zur Stammhaltung wird alle 14 Tage der Teststamm auf Schräg-Agar überimpft, bei 30°C 24 Stunden bebrütet und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Herstellung der Impflösung wird die frisch bebrütete Agarplatte mit 10 ml 0,9 % NaCl ausgewaschen; die Zellsuspension wird bis zu einer Extinktion von 0,145 bei 530 nm gebracht und anschließend noch einmal im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Vitamin B₆-Bestimmung erfolgt durch Zugabe von 1 ml Impflösung in 10 ml Testnährmedium. Dieses Testnährmedium nach KOZELUHOVA (1969) ist im Vergleich zu dem nach BARTON-WRIGHT (1967) in seiner Konzentration drastisch verringert. Die Turbiditätsmessung erfolgt nach 24stündiger Bebrütung bei 30°C bei 530 nm Wellenlänge. Als Ergebnis erhält KOZELUHOVA (1969) eine Standardkurve, die ihm für PAM-Hydrochlorid einen Meßbereich von 0 - 100 µg% ermöglicht. BARTON-WRIGHT (1967) erhält einen Meßbereich von 0 - 50 µg%.

3.5.4. Bestimmung mit Schimmelpilzen

3.5.4.1. Test mit Neurospora sitophila

3.5.4.1.1. STOKES, LARSEN, WOODWARD und FORSTER (1943) und TATUM, RITCHEY, COWDRY und WICKS (1946) haben eine Vitamin B₆-Bestimmungsmethode mit dem Schimmelpilz Neurospora sitophila ATCC 9276 entwickelt. STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) und MÜCKE (1957) beschreiben gemeinsam die Methode nach STOKES, LARSEN, WOODWARD und FORSTER (1943) mit einigen Modifikationen nach BARTON und WRIGHT (1967) zur Vitamin B₆-Gesamtbestimmung. McKUSICK, SHERWIN, GRUPENHOFF, JONES und HSU (1964) weisen mit der Methode nach STOKES, LARSEN, WOODWARD und FORSTER Vitamin B₆ im Urin nach. KHEIM und KIRK (1967) bestimmen nach der Methode von TATUM, RITCHEY, COWDRY und WICKS (1946) Vitamin B₆ in arteriellem und venösem Gewebe. MÜCKE (1957) verwendet als Einziger Neurospora sitophila zur Vitamin B₆-Gesamtbestimmung in der Differentialbestimmungsmethode.

3.5.4.1.2. Der Neurospora-sitophila-Test war zum Zeitpunkt seiner Entwicklung einfacher und schneller als der biologische Test und empfindlicher als physikalische und chemische Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden. Im Gegensatz zu den Bakterientests ist er für Gesamtvitamin B₆ gleichermaßen empfindlich und kann deshalb am besten mit dem Saccharomyces carlsbergiensis-Test ver-

glichen werden.

STOKES, LARSEN, WOODWARD und FORSTER (1943) stellen folgende Vorzüge ihrer Methode heraus.

-Die Werte, die sich für verschiedene Konzentrationen für ein und die selbe Substanz ermitteln, stimmen gut überein.

-Sie erzielen gute Reproduzierbarkeit.

-Die Streuung der Ergebnisse liegen in der Größenordnung anderer mikrobiologischer Methoden.

-Vitaminwerte, die sie für Fleisch und Getreide erhalten, sind mit denen gut vergleichbar, die mit anderen Methoden bestimmt worden sind.

-Als einzige Vitamin B₆-Bestimmungsmethode wird für *Neurospora sitophila* die gravimetrische Auswertung beschrieben. Aus diesem Grund eignet sich diese Methode ganz besonders zur Vitaminbestimmung in stark gefärbten oder trüben Lösungen.

3.5.4.1.3. Zur Stammhaltung werden die Kulturen im Schräg-Agar 4 bis 5 Tage bei 30°C bebrütet und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Die Überimpfung erfolgt alle 3 bis 4 Wochen. Zur Darstellung der Impflösung wird eine besondere Nährlösung mit *Neurospora sitophila* beimpft, bebrütet und eingengt. Da das Wachstum von *Neurospora sitophila* selbst durch geringe Thiaminmengen bei Anwesenheit suboptimaler Vitamin B₆-Mengen stimuliert wird, muß Thiamin im Testsubstrat vor der Bestimmung zerstört werden.

Zur Durchführung der Bestimmung werden 5 ml doppelt starkes Testmedium 10 ml auf pH 4,5 abgepuffertes Testsubstrat und 1 Tropfen Impflösung 5 Tage lang im Brutschrank bei 30°C gehalten. Zur Auswertung der Ergebnisse wird das Mycel abgenutscht, mit Wasser ausgewaschen, 2 Stunden bei 100°C getrocknet und dann gewogen.

3.5.5. Bestimmung mit Ciliaten

3.5.5.1. Test mit *Tetrahymena pyriformis*

3.5.5.1.1. BAKER und SOBOTTKA (1962) und BAKER, FRANK, NING, GELLENE, HUTNER und LEEVY (1966) beschreiben die Vitamin B₆-

Bestimmungsmethode mit *Tetrahymena pyriformis*. Diese Methode wird von STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964) diskutiert. Für BAKER und SOBOTTKA (1962) sind weder die direkten noch die indirekten Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden ausreichend verlässlich, um klinische Vitamin B₆-Mangelzustände bestimmen zu können. Dies führte sie zur Entwicklung eines Tests auf Vitamin B₆ in biologischen Flüssigkeiten und Geweben mit dem Ciliat *Tetrahymena pyriformis*, variety 1, mating type II. Dieser Organismus ist nur für diejenigen B₆-Vitamerie empfindlich, für welche der Säugetierorganismus empfindlich ist.

3.5.5.1.2. Die Stammhaltung erfolgt in einer Lösung aus 9 ml 1,1 %iger proteose peptone und 1 ml 10 %ige Glucose. Diese Lösung wird mit dem Organismus beimpft und bei 29 bis 32°C bebrütet.

Zur Herstellung der Impflösung wird *Tetrahymena pyriformis* im speziellen Nährmedium 3 Tage bei 29 bis 32°C bebrütet. Zur Durchführung der Bestimmung werden 1 Tropfen Impflösung, Nährlösung und Probe bebrütet und zur quantitativen Auswertung anschließend bei 650 nm nephelometrisch gemessen.

3.5.5.1.3. *Tetrahymena pyriformis* ist für PAM, PAL und PALP fast gleich wachstumsempfindlich. Zu gleicher Wachstumsreaktion benötigt es dagegen 120 bis 150 mal mehr POL, so daß sich für die ersteren ein Meßbereich von 0,03 - 10 µg%, für POL aber ein Meßbereich von 3 - 1000 µg% ergibt. BAKER und Mitarbeiter (1966) bestimmten den Vitamin B₆-Gehalt im biologischen Gewebe. Die Tabelle 27 enthält die Vitamin B₆-Werte für Patienten die klinische und hämatologische Anzeichen von Vitamin B₆-Mangel hatten.

Tabelle 27: Vitamin B₆-Werte von Patienten mit Vitamin B₆-Mangelsymptomen nach BAKER und SOBOTTKA (1962)

Analyseproben	Vitamin B ₆ -Gehalt ng/mg
Blut	20- 45
Serum	30- 80
rote Blutzellen	13- 31
Urin	20-120
Leber (Biopsie)	5- 20
Muskel (Biopsie)	2- 6
Gesamthirn	20- 25
graue Substanz	12- 17

3.6. Die biologischen Bestimmungsmethoden

3.6.1. Allgemeines

Die letzte Gruppe der Bestimmungsmöglichkeiten für das Vitamin B₆ ist der biologische Test. Beruhten die Entdeckungen und die Frühgeschichte des Vitamins hauptsächlich auf den Ergebnissen der biologischen Testverfahren und war der biologische Test noch am Anfang der 50iger Jahre als bedeutende Bestimmungsmethode für das Vitamin B₆ unbestritten, so nimmt er heute als Spezialverfahren der Vitamin B₆-Bestimmung, eine Sonderstellung ein.

3.6.1.1. Grundsätzlich stellt der biologische Test ein unerlässliches Hilfsmittel der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Vitamine und der essentiellen Wachsfaktoren dar. An die physiologische Wirkung dieser Wachsfaktoren gebunden, ist er in allererster Linie ein qualitativer Test. Durch die Betonung quantitativer Gesichtspunkte können diese physiologisch ausgerichteten Versuchsmethoden zur quantitativen Messung herangezogen werden.

3.6.1.2. Im Prinzip beruht der biologische Test auf dem Vergleich der Wirksamkeit eines zu untersuchenden Materials mit der Wirksamkeit der definierten Menge eines Standardmaterials in einem dazu geeigneten Organismus. Als Maßstab für diese Wirksamkeit dient die Heilung eines Mangelzustandes, d.h. die Beseitigung einer durch Nahrung induzierten Avitaminose mit ihren objektiven Merkmalen. Damit unterscheidet sich der biologische Test vom mikrobiologischen Test, bei welchem das Wachstum, d.h. Vermehrung der Mikroorganismen, das Kriterium für die Wirksamkeit der Testsubstanz ist.

3.6.1.3. Die Merkmale dieser Mangelzustände müssen qualitativ und quantitativ erfaßbar gemacht werden, bevor sie als Grundlage für eine Messung herangezogen werden können.

Vitamin B₆-Mangelsymptome sind für den Menschen und eine große Anzahl von Tieren beschrieben worden. Sie äußern sich durch Störungen des Allgemeinbefindens, durch Störungen der Haut und Kopfschleimhaut, Schädigungen im Nervensystem, von Auge, Blut, Verdauungs- und Fortpflanzungssystem (Anonymus 1970 a). Folgende Vitamin B₆-Mangelercheinungen an Ratte, Küken und der Triboliumlarve wurden quantitativ objektivierbar gemacht und werden zur Durchführung des biologischen Tests induziert.

Ratte: -Wachstumsstillstand

-Akrodynie (Symmetrische Hautentzündungen an akralen Stellen)

-erhöhte Xanthurensäureausscheidung

Küken: -Wachstumsstillstand

-tonische Krämpfe

-gestörte Federentwicklung

-Tod

Triboliumlarve: -Wachstumsverminderung

-Reifungshemmung

-Untergang der Larve

Wachstumshemmung und ihre Beseitigung wird über umfangreiche Tiergewichtsbestimmungen in Abhängigkeit von der Zeit meßbar gemacht. Die Akrodynie, d.h. symmetrische Hautentzündungen an

den akralen Stellen, müssen vor der quantitativen Bestimmung in verschiedene Ausprägungsgrade eingeteilt werden; lediglich die Menge der im Urin ausgeschiedenen Xanthurensäure kann ohne Umstände und einwandfrei vom Laboranten bestimmt werden.

3.6.1.4. Es spielt beim biologischen Test keine Rolle, ob das Vitamin B₆ in der Analysenprobe frei oder enzymgebunden vorliegt. Das Verdauungssystem des Tierorganismus übernimmt im Sinne der "Vorbestimmungsmethoden" die Funktion des hydrolytischen Aufschlusses.

Chromatographische Auftrennungsverfahren erübrigen sich ebenfalls, da ja die einzelnen Vitamin B₆-Derivate im tierischen Organismus ineinander umgewandelt werden können. Damit entfaltet jedes metabolisch aktive Vitamin B₆-Derivat im Organismus die gleiche Vitamin B₆-spezifische Wirkung. Schon 1945 konnten SNELL und RANNEFELD an 17 Organismen nachweisen, daß POL und PAL für die Wachstumsreaktion "Mol für Mol" etwa gleiche Wirkungen besitzen.

3.6.1.5. Die Einteilung der biologischen Bestimmungsmethoden erfolgt unter den Gesichtspunkten, welche Mangelercheinungen an welchem Tier gemessen werden. Akrodynietestverfahren sind für die Ratte, Wachstumstestverfahren sind für Ratte, Küken und Triboliumlarve und schließlich Xanthurensäureausscheidungs-tests für die Ratte beschrieben worden.

Darüberhinaus ist es von Interesse, ob ein Test kurativ oder präventativ durchgeführt wird. Beim kurativen Test werden die geringsten Mengen des Vitamins bestimmt, welche die Avitaminose heilen, beim präventativen Test werden die geringsten Mengen des Vitamins bestimmt, welche die Avitaminose verhüten. Biologische Testverfahren werden von BLISS und GYÖRGY (1951) und FRAGNER (1964/65) ausführlich beschrieben und in ihrer Wertigkeit diskutiert.

3.6.2. Akrodynietest

Das älteste Bestimmungsverfahren für Vitamin B₆ hat sich nicht durchsetzen können und findet bei BLISS und GYÖRGY (1951) und FRAGNER (1964/65) nur kurze Erwähnung.

3.6.2.1. HALLIDAY und EVANS (1937) teilten die Dermatiden einer jeden erkrankten Ratte in fünf Ausprägungsgrade (0,+,++,+++,++++) ein. Nach einer Periode der Mangeldiät (4-5 Wochen) bestimmten sie den Durchschnittswert der Ausprägungsgrade der Akrodynie bei allen Ratten. Sie bewerteten anschließend die Heilwirkung in Abhängigkeit von der Testdosis.

3.6.2.2. SCHNEIDER, ASCHAM, PLATZ und STEENBOCK (1939) bestimmten die Minimaldosis des Vitamin B₆, welche die Hautsymptome konstanten Ausmaßes vollständig zu heilen in der Lage waren. Ein anderer Autor verfütterte an Mangelratten eine einzige Dosis Vitamin B₆ und verfolgte 14 Tage lang den Heilungsverlauf. Der Prozentsatz der Heilung war Funktion der verabreichten Pyridoxinmenge.

3.6.2.3. Aus folgenden Gründen wurde der Akrodynietest als quantitatives Bestimmungsverfahren fallen gelassen:

- die Akrodynie ist nur ein Begleitsymptom des Vitamin B₆- Mangels, da sie durch Vitamin F-Gaben geheilt oder doch zumindest gelindert wird.
- Akrodynie kann im Mangelversuch durch wenig spezifische Diätfaktoren zusätzlich erzeugt werden, wenn z.B. der Proteingehalt der Mangeldiät auf Kosten der Saccharose von 18 auf 30 % erhöht wird.
- Die Akrodynie als pathologisches Begleitsymptom des Vitamin B₆-Mangels ist qualitativ und quantitativ schlecht erfassbar.
- Akrodynieerscheinungen variieren mit Alter, Wurf und Geschlecht des Tieres und mit der Jahreszeit.

3.6.3. Wachstumstest

3.6.3.1. Der Rattenwachstumstest ist ein kurativer Test. Er gliedert sich in seinem Versuchsablauf in die Vorbereitungszeit und den Zeitraum des eigentlichen Versuches. Die Verfahren verschiedener Autoren unterscheiden sich nur in einigen Modifikationen. Das Ziel der Vorbereitungszeit ist die sogenannte "Mangelratte".

Die Karenzperiode der 16. bis 19. Tage alten Ratten beginnt während der Säugezeit. Zu diesem Zeitpunkt erhält die Mutter und nach dem "Abbinden" am 21. Tage die jungen Ratten eine Vitamin B₆-freie Mangel diät verfüttert. Diese Mangel diät gewährt ein Minimum an Wachstum während der Mangelzeit und ein Maximum an Wachstum bei optimaler Vitamin B₆-Zufuhr.

Tabelle 27: Die folgenden Tabellen enthalten die Zusammenstellung einer solchen Mangel diät.

a) Mangel diät nach ELVEHJAM (1947)

Blutfibrin	18 g
Saccharose	75 g
Salze	4 g
Maisöl	<u>3 g</u>

100 g zusätzlich Vitamine und Spurenelemente,
außer Vitamin B₆

b) Mangel diät nach KÖRNER und NOWAK (1966 a und b)

Casein (Merck)	26 %
Reisstärke	55 %
Rohrzucker	6 %
Palmin	9 %
Salze	<u>4 %</u>

100 % zusätzlich Vitamine und Spurenelemente,
außer Vitamin B₆

Nach BLISS und GYÖRGY (1951) ist dieser Mangelzustand erreicht, wenn die Ratte entweder in zwei aufeinanderfolgenden Wochen nicht mehr zugenommen hat, oder nach dreimaligem Wiegen nicht mehr als 3 g zugenommen hat. Dieses ist im Durchschnitt nach 40 bis 42 Tagen der Fall. Nach ELVEHJEM (1947) ist der Mangelzustand nach 21 bis 28 Tagen erreicht, wenn die Ratte in zwei aufeinanderfolgenden Wochen nicht mehr als 8-10 g zugenommen hat. Während der Versuchszeit wird die eigentliche Vitaminbestimmung als sogenannter Dreigabentest durchgeführt. Als Ver-

gleichstandard dient Pyridoxol in den Mengen von 1-50 μ g ohne Nahrung oder 25-100 μ g/100 g Mangelnahrung. Anschließend werden die Gewichtsänderungen der Tiere gemessen. Trägt man den Gewichtszuwachs pro Woche gegen den Logarithmus der verabreichten Pyridoxinmenge auf, so erhält man eine Standardkurve. Diese Kurve ist für 1-50 μ g Vitamin B₆ ohne Nahrung und 25-100 μ g Vitamin B₆ pro 100 g Mangelnahrung linear. Die Menge der verabreichten Testgaben kann dann aus den entsprechenden Geraden interpoliert werden.

3.6.3.2. Der Kükenwachstumstest wird in den zwei Modifikationen, als kurativer und als prophylaktischer Test beschrieben.

3.6.3.2.1. OTT (1946) beschreibt den kurativen Kükentest. Zur Durchführung werden einen Tag alte weibliche, weiße Leghornküken bis zum 4. Tag mit üblichem Kükenfutter und an den 6 folgenden Tagen mit der Mangeldiät nach OTT (1946) gefüttert. Am 11., 13., 15. und 17. Tag wird ihnen, je nach Gruppe, 0-24 μ g Pyridoxol Standardlösung und die zu untersuchende Probe verabreicht. Die mittlere tägliche Gewichtszunahme wird das Maß für die Menge des verabreichten Vitamin B₆. Die Gewichtszunahme in Abhängigkeit vom Logarithmus der Menge des verfütterten Vitamin B₆ ergibt eine lineare Standardkurve, aus welcher die unbekannte Menge interpoliert werden kann.

3.6.3.2.2. SARMA, SNELL und ELVEHJEM (1946) beschreiben den prophylaktischen Kükentest. Im prophylaktischen Kükenwachstumstest werden die einen Tag alten weißen Leghornküken sofort auf Mangeldiät gesetzt. Unter dieser Mangeldiät sind je nach Gruppe 100 bis 150 μ g Pyridoxol/100 g Nahrung gemischt. Nach 3 Wochen erhält man, wie im kurativen Kükentest, die lineare Abhängigkeit zwischen Gewichtszunahme und dem Logarithmus der verabreichten Pyridoxinmenge.

3.6.3.3. SCHWARZ und KOCH (1963) haben ein Testverfahren entwickelt, in welchem sie mit Hilfe der Larve von *Tribolium confusum* D pflanzliche und tierische Stoffe quantitativ auf

acht B-Vitamine, B₁, B₂, Nikotinsäureamid, panthothensaures Calcium, D-Biotin, Folsäure, Cholinchlorid und Vitamin B₆ hin untersuchen. Bei ihrer Arbeit stützen sie sich auf die Tatsache, daß diese acht B-Vitamine als essentielle Wachsfaktoren für Tribolium bekannt sind. Mit Testdiäten, denen die Vitamine mengenmäßig variabel zugesetzt werden, bestimmten SCHWARZ und KOCH (1963) eine untere und eine obere Grenze der Vitamin B-Mengen, für welche sich 90 bis 99 % der Tiere verpuppen konnten. In Abhängigkeit von der Vitamindosis dauert dann das Larvenstadium von Tribolium confusum 4 bis 12 Wochen. Somit ist die Entwicklungsdauer der Larve ein Maßstab für die zugeführte Vitamin B-Menge. Der Triboliumtest kann kein Testverfahren der Vitamin B₆-Bestimmung, unserer Aufgabenstellung entsprechend, sein. Dagegen sprechen sowohl zeitliche Gründe, als auch Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und Spezifität des Nachweises. Dieses Testverfahren nach SCHWARZ und KOCH (1963) ist aber ein anschaulicher Beitrag zur Wachstumsreaktion des Organismus auf Vitamingabe und Vitaminmangel.

3.6.4. Xanthurensäureausscheidungstest

Die Messung der Xanthurensäureausscheidung nach vorangehender L-Tryptophanbelastung ist schon lange ein bewährtes klinisches Verfahren zur Früherkennung eines Vitamin B₆- Mangels. Hierbei wird die Menge der Xanthurensäure nach einmaliger oraler Belastung mit 150 bis 200 mg L-Tryptophan pro kg Körpergewicht gemessen. Diese Methode läßt keine genaue quantitative Aussage über den Vitamin B₆-Defizit zu. Auch der "Xanthurensäureindex" nach CHIANCONE setzt zur quantitativen Bewertung des Vitamin B₆-Defizites voraus, daß bei gleich stark ausgeprägtem Vitamin B₆-Mangel nach Gabe gleicher Tryptophandosis, gleiche Mengen von Xanthurensäure im Urin ausgeschieden werden. Nach KÖRNER und NOWAK (1966 a und b) wurde der Tryptophanbelastungstest zu einem Test zur mengenmäßigen Bestimmung von Substanzen mit Vitamin B₆-Wirksamkeit modifiziert. Wie bei den Wachstumstests gliedert sich der Versuchsablauf in die Vorbereitungszeit und in die eigentliche Versuchszeit.

Nach 8 Wochen Mangeldiät werden mehrere Testgruppen von Mangelratten gebildet. Die Tiere jeder Gruppe werden 4 Tage vor und 4 Tage nach der einmaligen Gabe einer bestimmten Vitamin B₆-Standardmenge mit 20 mg L-Tryptophan pro 100 g Körpergewicht belastet. Im 24-Stundenharn wird die ausgeschiedene Xanthurensäure bestimmt. Der Mittelwert der Xanthurensäureausscheidung des 1. bis 4. Tages vor Applikation der Prüfsubstanz und der Mittelwert der Xanthurensäureausscheidung des 1. bis 4. Tages nach Applikation der Prüfsubstanz ergeben den Xanthurensäureausscheidungs-Quotienten. Dieser Quotient ist ein relatives Maß für die Vitamin B₆-Wirksamkeit. Trägt man die Logarithmen dieser Quotienten aus den verschiedenen Testgruppen gegen den Logarithmus der Standardmengen auf, dann erhält man eine Gerade, aus welcher die Menge der Prüfsubstanz interpoliert werden kann.

KÖRNER und NOWAK (1966 b) liefern für diese Versuchsanordnung selber eine Modifikation. Hier ist die Versuchsdauer auf insgesamt 30 Tage beschränkt. Die Karenzperiode wird von 8 Wochen auf 20 Tage verkürzt, dafür wird aber der Xanthurensäureausscheidungs-Quotient während der Versuchsperiode vom 1. bis 5. Tag vor und nach Applikation der Vitamin B₆-Standardmenge errechnet.

3.6.5. Zusammenfassung

Zur abschließenden Beurteilung stehen der Ratten- und Kükenwachstumstest und der Xanthurensäureausscheidungstest zur Diskussion. Der biologische Test stellte ursprünglich die einzige und leicht überschaubare Nachweismethode der Vitamin B₆-Bestimmung dar. In der praktischen Durchführung stellt er den Laboranten vor große Schwierigkeiten und Aufwand, birgt in sich viele Fehlerquellen und liefert ein unsicheres Ergebnis.

Die grundlegende Bedingung für eine sichere Bestimmung ist die Auswahl der Tiere in Bezug auf Geschlecht, Alter, Gewicht, Anzahl und Wurf (BLISS und GYÖRGY 1951, KNOBLOCH 1963). Vergleicht man z.B. die Streuwerte beim Rattenwachstumstest innerhalb eines Wurfs, stellt man fest, daß sie bei Weibchen geringer sind, als bei Männchen (BLISS und GYÖRGY 1951; vergleiche dazu Tabelle 28).

Tabelle 28: Streuwerte beim Rattenwachstumstest nach BLISS und GYÖRGY (1951)

Streuwert für	Männchen	Weibchen
3-Wochentest	0,140 $\pm$ 0,021	0,104 $\pm$ 0,014
4-Wochentest	0,149 $\pm$ 0,022	0,107 $\pm$ 0,015

In enger Beziehung zur Genauigkeit des biologischen Versuches stehen Gewicht und Alter und Verwandtschaftsgrad der Versuchstiere. Am besten werden nur Tiere aus einem Wurf und mit gleichem Gewicht verwendet. Um sich gleichzeitig auf eine breite statistische Basis stellen zu können, lohnt sich nur die Auswahl aus einer großen Zucht. Hohe Anforderungen werden an die Tierhaltung gestellt. Krankheiten und Kannibalismus verändern das Versuchsergebnis.

Die Diät muß lange Zeit gleichbleibend zusammengestellt werden. Sie wird am besten nur aus chemisch-definierten Nährstoffen hergestellt. Der zeitliche und materielle Aufwand rechtfertigen das unsichere Ergebnis nicht. Die Nachweisgrenze der Wachstumsteste liegt bei 1 μ g Vitamin B₆, die Mindestdauer des Versuchsablaufes sind 17 Tage. Zudem streuen die Messungen erheblich und sind nur bedingt reproduzierbar. Eine Ausnahme bildet die Versuchsanordnung nach KÖRNER und NOWAK (1966 a und b). Die Autoren geben an, daß bei dieser Versuchsanordnung eine im Vergleich zu testende Substanz aus dem Kurvenverlauf der Vitamin B₆-Wirksamkeit mit einer Genauigkeit von 1 ‰ abgelesen werden kann. Damit stellt der biologische Test dieser Versuchsanordnung ein gutes Mittel zur quantitativen Erfassung von Vitamin B₆-Vitameren und Vitamin B₆-Antagonisten dar.

4. Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, den Themenkreis der Vitamin B₆-Bestimmung unter der besonderen Berücksichtigung von Mikrobestimmungsmethoden abzuhandeln. Hierbei fand die entsprechende Literatur bis einschließlich 1970 Verwendung.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Systematik wurde es notwendig, die Vitamin B₆-Bestimmung einmal in Vorbestimmungsmethoden und Bestimmungsmethoden zu unterteilen. So beginnt im allgemeinen die qualitative wie auch quantitative Vitamin B₆-Bestimmung mit den Methoden der Vorbestimmung, d.h. mit Extraktion und chromatographischer Auftrennung. Lediglich in besonderen Fällen, wenn z.B. das Vitamin als Reinstpräparat oder in Multivitaminpräparaten untersucht werden soll, erübrigen sich die Extraktion und teilweise auch die chromatographische Auftrennung. Erst wenn das Vitamin in isolierter Form vorliegt, kann es mit Hilfe der Bestimmungsmethoden eindeutig erfaßt werden.

Bei den Extraktionsverfahren unterscheiden wir die saure, basische und die enzymatische Hydrolyse. Die saure Hydrolyse dient zur Extraktion der Vitamin B₆-Derivate, hauptsächlich in Verbindung mit einer anschließenden Bestimmung durch Mikroorganismen.

Indikation für die basische Hydrolyse ist die Darstellung des Pyridoxalphosphates. Dieses wird dann meist enzymatisch bestimmt.

Zwei Autoren beschreiben Methoden der enzymatischen Hydrolyse. Diese dient zum Aufschluß des gesamten Vitamin B₆, in Verbindung mit enzymatischen, aber auch mikrobiologischen Bestimmungsmethoden. Abgesehen von diesen speziellen Indikationen soll noch einmal auf die Problematik der Hydrolyse hingewiesen werden: es ist nicht eindeutig geklärt, wie sich freies oder gebundenes Vitamin in der Analysenprobe während der Hydrolyse verhalten; die aus biologischem Material erhaltenen Werte müssen als Ergebnisse der Extraktionsmethode gewertet werden!

Fast alle in der Arbeit beschriebenen Auftrennungsmethoden befriedigen durch große Genauigkeit, Sicherheit und Empfindlichkeit ihre Trennfunktionen. Die Wahl der geeigneten Methode ist einmal abhängig von der Menge der Substanz, die man untersuchen möchte, zum anderen von der Frage, ob sich das aufgetrennte Vitamin B₆ zur anschließenden Bestimmung in einer Lösung oder auf einem Schichtträger befinden soll.

Die Ionenaustauschchromatographie wird dort bevorzugt eingesetzt, wo größere Substanzmengen anfallen und wo sich das Vitamin zur weiteren Reaktion in einem Eluat befinden soll. Dies ist meist dann der Fall, wenn die Substanz anschließend polarographisch, enzymatisch, mikrobiologisch oder chemisch bestimmt werden soll.

Papierchromatographie, Dünnschichtchromatographie und elektrophoretische Trennung empfehlen sich, wenn entweder geringste Mengen aufgetrennt werden müssen, oder aber die Bestimmung des Vitamins unter einer UV-Lampe erfolgen soll.

Die Verwendung der Gaschromatographie bei der Vitamin B₆-Bestimmung kann Sonderaufgaben vorbehalten bleiben, da das Vitamin vor seiner Auftrennung zusätzlich in verdampfbare Derivate übergeführt sein muß.

Bei den Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden wurden eine große Anzahl von Möglichkeiten aufgezeigt, unter denen sich eine Reihe von Methoden befinden, die in ihrem Aufbau zu aufwendig oder im Meßergebnis zu ungenau sind und denen deshalb nur noch historische Bedeutung zukommt; auf sie wurde an geeigneter Stelle hingewiesen. Andererseits konnten besonders moderne Verfahren aufgezeigt werden, die durch große Spezifität, niedrige Nachweisgrenze und Sicherheit im Ergebnis ausgezeichnet sind.

Die Wahl der geeigneten Methode richtet sich einerseits danach, welche Laborausüstung zur Verfügung steht und welchen Arbeits-, Material- und Zeitaufwand man bereit ist in Kauf zu nehmen. Andererseits richtet sie sich auch nach der Aufgabenstellung, d.h. sie ist abhängig von der Frage, welches Vitamin B₆-Derivat bestimmt werden soll, und von der Frage, ob dieses Deri-

vat z.B. in pharmazeutischen Präparaten oder in Biopsiematerial vorhanden ist. Physikalische, chemische, enzymatische und mikrobiologische Methoden sind generell für diese beiden unterschiedlichen Aufgabenstellungen gleichermaßen geeignet. Lediglich die biologischen Bestimmungen haben ihre Bedeutung als reine Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden verloren und finden nur noch als Methoden zur Bestimmung von Vitaminaktivitäten Verwendung.

Bei den physikalischen Bestimmungsmethoden zeichnen sich die spektrophotometrischen und fluorometrischen Messungen durch Einfachheit, Schnelligkeit und Empfindlichkeit aus. Mit diesen Verfahren können alle Derivate der Vitamin B₆-Gruppe erfaßt werden.

Mit Hilfe der Polarographie sind Pyridoxol-, Pyridoxal- und Pyridoxalphosphatbestimmungen beschrieben worden. Auch die Polarographie zeichnet sich durch Einfachheit und Schnelligkeit, aber auch etwas geringerer Empfindlichkeit aus. Sie eignet sich zur Serienbestimmung von Pyridoxol, Pyridoxal und Pyridoxalphosphat in pharmazeutischen Präparationen.

Kernresonanz-, Infrarot- und Massenspektroskopie könnten zur Vitamin B₆-Bestimmung ohne weiteres herangezogen werden. Auf Grund des labortechnischen Aufwandes wird ihre Anwendung auf spezielle Aufgaben der Vitamin B₆-Forschung beschränkt bleiben müssen.

Von den chemischen Vitamin B₆-Bestimmungsmethoden sind die emissionsphotometrischen Bestimmungen besonders hervorzuheben. Mit Hilfe der Lactonmethode sind die Bestimmungen von Pyridoxsäure, Pyridoxol, Pyridoxal und Pyridoxamin, mit Hilfe der Cyanidmethode sind die Bestimmungen für Pyridoxol, Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxalphosphat ausgearbeitet worden. Beide Verfahren zeichnen sich durch hohe Spezifität, Schnelligkeit in der Ausführung und einer großen Empfindlichkeit aus. Für beide Verfahren sind Mikromethoden beschrieben worden.

Enzymatische Bestimmungen haben für das Vitamin B₆ in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewinnen können. Ihr

Indikationsbereich ist auf die Bestimmung von Pyridoxalphosphat und lediglich in einem Fall auf die Bestimmung von Pyridoxalphosphat und Pyridoxaminphosphat beschränkt. Diese Einschränkung in der Anwendungsbreite kann als ein bedeutender Vorteil der enzymatischen Bestimmungen gegenüber allen übrigen Methoden angesehen werden, wenn es gilt, ausschließlich das Coenzym für enzymologische und besondere klinische Untersuchungen zu erfassen. Sämtliche enzymatische Bestimmungsmethoden gestatten den Nachweis geringster Mengen mit sehr großer Spezifität. Die Empfindlichkeit dieser Methoden kann durch die Verwendung isotoopenmarkierter Substrate erheblich gesteigert werden.

Die Bestimmungen des Vitamin B₆ in Nahrungs- und Futtermitteln und anderem biologischen Material werden bei der Mehrzahl der Autoren mit mikrobiologischen Methoden durchgeführt. Hierbei sind besonders zwei Verfahren herausgearbeitet worden. Die erste Methode beruht auf der selektiven Empfindlichkeit dreier verschiedener Testorganismen für die einzelnen Vitamin B₆-Derivate. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß das Hydrolysat nicht chromatographiert zu werden braucht. Im zweiten Fall werden die chromatographierten Vitamin B₆-Derivate an den Teststamm *Saccharomyces carlsbergiensis* verabreicht. Der größte Teil aller mikrobiologischen Bestimmungen werden mit diesem Teststamm durchgeführt, da *Saccharomyces carlsbergiensis* ATCC 9080 für alle Vitamin B₆-Derivate gleichermaßen empfindlich ist und andere Substrate, die zu Vitamin B₆ antagonistische oder synergistische Wirkung besitzen, für diesen Teststamm nicht bekannt sind.

5. Literaturverzeichnis

1. ADAMS, E.
Fluorometric determination of pyridoxal phosphate
in enzymes
Anal. Biochem. 31, 118 (1969 a)
2. ADAMS, E.
Reaction of dithionite and bisulfite with pyridoxal
and pyridoxal enzymes
Anal. Biochem. 31, 484 (1969 b)
3. AHRENS, H., KORYTNYK, W.
Pyridoxine chemistry
III. Thin-layer chromatography and thin-layer
electrophoresis of compounds in the vitamin B₆ group
Anal. Biochem. 30, 413 (1969)
4. AHRENS, H., KORYTNYK, W.
Thin-layer chromatography and thin-layer electro-
phoresis of vitamin B₆
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B. McCormick und L.D. Wright
Academic Press, New York-London (1970)
5. ALIEV, A. M.
A new light reaction of vitamin B₆ and its
spectrophotometric examination
Aptech. Delo. (Moskva) 13, 31 (1964 a)
6. ALIEV, A. M.
A new colorimetric method for determining
pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical
preparations
Aptech. Delo. (Moskva) 13, 40 (1964 b)

7. ALIEV, A.M.
Studies concerning analysis of vitamins of the B₆ group and their pharmaceutical preparations
Farm. Zh. (Kiev) 23, 40 (1968)

8. ANDERSON, F.J., MARTELL, A.E.
Pyridoxal phosphate: molecular species in solution
J. Amer. Chem. Soc. 86, 715 (1964)

9. ARATA, J., TANIOKU, K.
Proc. Symp. Chem. Physiol. Pathol., Japan 5, 105 (1965)
Zit.: OKUDA, FUJI, WADA (1970)

10. ATKIN, L., SCHULTZ, A.S., WILLIAMS, W.L., FREY, C.N.
Yeast microbiological methods for determination of vitamins. Pyridoxine
Ind. Eng. Chem. (Anal. ed.) 15, 141 (1943)

11. ANONYMUS
Vitamin-Compendium
Hrsg.: F. Hoffmann-La Roche
Basel, Schweiz (1970 a)

12. ANONYMUS
Nomenklatur der B₆-Vitamine und verwandter Verbindungen
Hoppe. Seyler. Z. Physiol. Chem. 351, 1165 (1970 b)

13. BAKER, H., FRANK, O., NING, M., GELLEN, R.A., HUTNER, S.H., LEEVY, C.M.
A protozoological method for detecting clinical vitamin B₆ deficiency
Amer. J. Clin. Nutr. (New York) 18, 123 (1966)

14. BAKER, H., SOBOTKA, H.
Microbiological assay methods for vitamin
in: Advances in Clinical Chemistry, Vol. V
Hrsg.: H. Sobottka und C. P. Stewart
Academic Press, New York (1962)
15. BARTON-WRIGHT, E. C.
The microbiological assay of vitamin B₆ complex and
inositol
J. of the Assoc. of Public Analysts 5, 131 (1967)
16. BENSON, E. M., PETERS, J., EDWARDS, M. A., STORVICK, C. A.
Problems in the microbiological determination of
vitamin B₆ in blood
Fed. Proc. 23, Abstracts 224 (1964)
17. BINA, A. F., THOMAS, J. M., BROWN, E. B.
The determination of vitamin B₆ (pyridoxine) in foods
J. Biol. Chem. 148, 111 (1943)
18. BLISS, C. I., GYÖRGY, P.
The animal vitamin assays
in: Vitamin Methods Vol. II
Hrsg.: P. György
Academic Press, New York (1951)
19. BOLLINGER, H. R.
in: Dünnschichtchromatographie
Hrsg.: E. Stahl
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1967)
20. BONASERA, N., SMARTO, M., BONA VITA, V.
Isoniazid seizures in the developing rat and the
content of pyridoxal 5-phosphate in the brain
Brain. Res. (Amsterdam) 4, 383 (1967)

21. BONAVIDA,V.
The reaction of pyridoxal 5-phosphate with cyanide and
its analytical use
Arch. Biochem. Biophys. 88, 366 (1960)

22. BONAVIDA,V., SCARDI,V.
Eine neue spektrophotometrische Methode zur Bestimmung
von Pyridoxal-5-phosphat
Z. analyt. Chem. 167, 207 (1959)

23. BOOTH,C.C., BRAIN,M.C.
The absorption of tritium-labeled pyridoxine-hydro-
chloride in the rat
J. Physiol. (London) 164, 282 (1963)

24. BOXER,G.E., PRUSS,M.P., GOODHART,R.S.
J. Nutr. 63, 623 (1957)
Zit.: STORVICK, McLEOD PETERS (1964)

25. BRIN,M.
A simplified Toepfer-Lehmann assay for the free
vitamin B₆ vitamers
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B.McCormick und L.D.Wright
Academic Press, New York-London (1970)

26. BROWN,E.B., BINA,A.F., THOMAS,J.M.
The use of diazotized p-aminoacetophenone in the
determination of vitamin B₆ (pyridoxine)
J. Biol. Chem. 158, 455 (1945)

27. BURG,R.W.
Catabolism of vitamin B₆
in: Methods in Enzymology, Vol. XVII
Hrsg.: D.B.McCormick und L.D.Wright
Academic Press, New-York-London (1970)

28. BURG, R.W., RODWELL, V.W., SNELL, E.E.
Bacterial oxidation of vitamin B₆ metabolites of
pyridoxamine
J. Biol. Chem. 235, 1164 (1958)
29. BURKHOLDER, P.R.
Biochem. J. 39, 101 (1943)
Zit.: MÜCKE (1957)
30. CANBÄCK, T.M., LINDHOLM, M.
Finska Kemistsamfunckts Medd 54, 134 (1954)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
31. CAPEK, K.E., KNOBLOCH, E.
Scientia Pharmaceutica (Wien) 26, 168 (1958)
Zit.: KNOBLOCH (1963)
32. CHABNER, B., LIVINGSTON, D.
A simple enzymic assay for pyridoxal phosphate
Anal. Biochem. (New York) 34, 413 (1970)
33. CHEN, R.F.
Fluorescence quantum yield measurements: vitamin B₆
compounds
Science 150, 1593 (1965)
34. CHURCHICH, J.E.
The phosphorescence properties of pyridoxal
5-phosphate
Biochim. Biophys. Acta. 79, 643 (1964)
35. CHURCHICH, J.E.
Fluorescence properties of pyridoxamine 5-phosphate
Biochim. Biophys. Acta. 102, 280 (1965)

36. COLOMBINI, C.E., McCOY, E.E.
Rapid thin-layer electrophoretic separation and estimation of all vitamin B₆ compounds and of some 5-hydroxyindoles
Anal. Biochem. 34, 451 (1969)

37. CONTRACTOR, S.F., SHANE, B.
Estimation of vitamin B₆ compounds in human blood and urine
Clin. Chim. Acta 21, 71 (1968)

38. CONTRACTOR, S.F., SHANE, B.
Quantitation of ¹⁴C and ³H pyridoxol by scintillation autoradiography of thin layer chromatograms
J. Chromatogr. 41, 483 (1969)

39. COURSIN, D.B., BROWN, V.C.
Measurement of compounds of vitamin B₆ group in blood
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 315 (1958)

40. COX, S.H., MURRAY, A., BOONE, J.U.
Metabolism of tritium-labeled pyridoxine in rat
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 242 (1962)

41. DeJONGH, D.C., KORYTNYK, W.
Mass spectrometry of vitamin B₆
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B. McCormick und L.D. Wright
Academic Press, New York-London (1970)

42. DeJONGH, D.C., PERRICONE, S.C., KORYTNYK, W.
A mass spectrometric investigation of pyridoxol, its C-5 analogs, and O-isopropylidene derivatives
J. Am. Chem. Soc. 88, 1233 (1966)

43. DIDING, N.A., MELANDER, S.E.J.
Acta Obstet. Gynecol. Scand. 40, 252-61 (1961)
Zit.: STORVICK und McLEOD PETERS (1964)
44. DONALD, E.A., FERGUSON, R.F.
A micro method for determination of pyridoxal
phosphate in leukocytes and liver
Anal. Biochem. 7, 335 (1964)
45. DONKERLO, T.W.
Some remarks regarding the manometric determination
of pyridoxal phosphate
Clin. Chim. Acta. 9, 572 (1964)
46. DUGGAN, D.E., BOWMAN, R.L., BRODIE, B.B., UDENFRIEND, S.
A spectrophotofluorometric study of compounds of
biological interest
Arch. Biochem. Biophys. 68, 1 (1957)
47. ELVEHJEM, C.A.
Biol. Symposium 12, 213 (1947)
Zit.: BLISS und GYÖRGY (1951)
48. FASELLA, P., LIS, H., SILIPRANDI, N., BAGLIONI, C.
Elektrophoretic and chromatographic study of some
chemical transamination reactions involving vitamin B₆
Biochim. Biophys. Acta. 23, 417 (1957)
49. FASELLA, P.C., TURANO, C., GIARTOSIO, A.
Bolletino Soc. Ital. Biol. Sper. 35, 2195 (1959)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
50. FISKE, C.H., SUBBAROW, Y.
J. Biol. Chem. 66, 375 (1925)
Zit.: HEDRICK und FISCHER (1965)

51. FLORKIN,M., STOTZ,E.
Separation methods
in: Comprehensive Biochemistry
Hrsg.: Florkin,M. und Stotz,E.
Elsevier Publishing Comp., Amsterdam-London-
New York (1962)
52. FOLIN,O., DENIS,W.
A colorimetric method for the determination of
phenols (and phenol derivates) in urine
J. Biol. Chem. 22, 305 (1915)
53. FORST,A.W.
Entgiftungsreaktionen
in: Physiologische Chemie - Ein Lehr- und Handbuch II/2
Hrsg.: V.B.Flaschenträger und E.Lehnartz
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966)
54. FRAGNER,J.
Vitamine, Chemie und Biochemie, Bd 1, Bd 2
Hrsg.: Fragner,J.
VEB G.Fischer-Verlag, Jena (1964/65)
55. FUJITA,A., FUJINO,K.
J. Vitaminol. (Osaka) 1, 290 (1955)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
56. FUJITA,A., FUJITA,D., FUJINO,K.
J. Vitaminol. (Osaka) 1, 275 (1955 a)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
57. FUJITA,A., FUJITA,D., FUJINO,K.
J. Vitaminol. (Osaka) 1, 279 (1955 b)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
58. FUJITA,A., MATSUURA,K., FUJINO,K.
J. Vitaminol. (Osaka) 1, 267 (1955)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)

59. FUKUI, S.
Differential determination of vitamin B₆ group
Anal. Chem. 25, 1884 (1953)
60. FUKUI, S., SAKAZAWA, C.
Vitamins (Kyoto) 9, 110 (1955)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
61. GAILANI, S.
Pyridoxal phosphate determination in isolated leukocytes
and tissue by E. coli apotryptophanase
Anal. Biochem. 13, 19 (1965)
62. GALE, E.F., EPPS, H.M.R.
Studies on bacterial amino-acid decarboxylases - dis-
tribution and preparation of codecarboxylase
Biochem. J. 38, 250 (1944)
63. GREENE, R.D.
Preparation of vitamin B₆ from natural sources
J. Biol. Chem. 130, 513 (1939)
64. GREGORY, M.E.
The effect of heat on the vitamin B₆ of milk
I. Microbiological tests
J. Dairy. Res. 26, 203 (1959)
65. GREGORY, M.E., MABBIT, J.
J. Dairy Res. 28, 293 (1961)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
66. GSTIRNER, F.
Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden
Enke-Verlag, Stuttgart (1965)

67. GUNSALUS, I.C., RAZZELL, W.E.
Pyridoxal kinase from brewer's yeast
in: Methods in Enzymology, Vol. II
Hrsg.: S.P.Colwick und N.O.Kaplan
Academic Press, New York-London (1955)
68. GUNSALUS, I.C., SMITH, M.
Methods in Enzymology, Vol. III
Hrsg.: S.P.Colwick und N.O.Kaplan
Academic Press, New York-London (1957)
69. GUSTAVSON, W.R., LEDIN, G., FÜRST, A.
Variation of R_f of vitamin B₆ group with pH
J. Chromatogr. (Amsterdam) 24, 288 (1966)
70. GYÖRGY, P.
Vitamin Methods Bd I, Bd II
Hrsg.: P.György
Academic Press, New York (1951 a)
71. GYÖRGY, P.
Chemical methods of vitamin assay
in: Vitamin Methods Bd I
Hrsg.: P.György
Academic Press, New York (1951 b)
72. HAENEL, H.
Mikrobiologischer Nachweis von B-Vitaminen
Nahrung 4, 116 (1960)
73. HAENEL, H., MÜLLER-BEUTHOW, W.
Beitrag zur mikrobiologischen Analyse mit Pilzen
Ernährungsforschung 1, 541 (1956)

74. HAKANSON, R.
Separation and identification of pyridoxal and
pyridoxal-5-phosphate by paperchromatography
J. Chromatogr. (Amsterdam) 13, 263 (1964)
75. HALLIDAY, N., EVANS, H.M.
On the reaktion of the vitamin B₂-complex from
various source materials
J. Biol. Chem. 118, 255 (1937)
76. HAMFELT, A.
A method of determing pyridoxal phosphate in blood by
decarboxylation of L-tyrosine-¹⁴C
Clin. Chim. Acta. (Amsterdam) 7, 746 (1962)
77. HAMFELT, A.
Age variation of vitamin B₆ metabolism in man;
Clin. Chim. Acta. (Amsterdam) 10, 48 (1964)
78. HAMFELT, A.
Enzymatic determination of pyridoxal phosphate in
plasma by decarboxylation of L-tyrosine-¹⁴C and a
comparison with the tryptophan load test
Scand. J. Clin. Lab. Invest. (Oslo) 20, 1 (1967)
79. HASKELL, B.E., SNELL, E.E.
Microbiological determination of the vitamin B₆ group
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B.McCormick und L.D.Wright
Academic Press, New York-London (1970)
80. HENNESSY, D.J., STEINBERG, A.M., WILSON, G.S., KEAVENEY, W.P.
Fluorometric determination of added pyridoxine in
enriched white flour and in bread baked from it
J. Assoz. Offic. Anal. Chemists. 43, 765 (1960)

81. HEYROVSKY, J.
Polarographisches Praktikum
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960)

82. HINES, J.D., LOVE, D.S.
Determination of serum and blood pyridoxal phosphate concentrations with purified rabbit skeletal muscle apophosphorylase b
J. Lab. Clin. Med. 73, 343 (1969)

83. HOCHBERG, M., MELNICK, D., OSER, B.L.
Chemical determination of pyridoxine reactions in pure systems
J. Biol. Chem. 155, 109 (1944 a)

84. HOCHBERG, M., MELNICK, D., OSER, B.L.
Chemical determination of pyridoxine in biological materials and pharmaceutical products. The multiple nature of vitamin B₆
J. Biol. Chem. 155, 119 (1944 b)

85. HOLZER, H.H., GERLACH, U., JACOBI, G., GNÖTH, M.
Anreicherung und Eigenschaften einer Transaminase aus Bierhefe
Biochem. Z. 329, 529 (1958)

86. HRAPIA, H.
Einführung in die Chromatographie
Academie-Verlag Berlin (1965)

87. HRDY, O., URBANOVA, L.
Pyridoxin in pharmazeutischen Präparaten
Z. Analyt. Chem. 163, 234 (1958)

88. HÜTTENRAUCH, R.
Analyse polymerer Vitamin B₆-Derivate
Arch. Pharm. (Weinheim) 21, 493 (1966)
89. HÜTTENRAUCH, R.
Galenik der Vitamine - Dünnschichtchromatographische
Strukturaufklärung des Pyridoxol-Borsäure-Komplexes
J. Chromatogr. 51, 330 (1970)
90. HÜTTENRAUCH, R., TÜMMLER, R.
Elektronenanlagerungs-Massenspektrographie von Polymeren
des Pyridoxols
Pharmazie (Berlin) 22, 561 (1967)
91. HUFF, J.W., PERLZWEIG, W.A.
A product of oxidative metabolism of pyridoxine,
2-methyl-3-hydroxy-4-carboxy-5-hydroxymethylpyridine
(4-pyridoxic acid) - Isolation from urine, structure
and synthesis
J. Biol. Chem. 155, 345 (1944)
92. IMANARI, T., TAMURA, Z.
Gaschromatography of compounds in vitamin B₆ group
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 15, 896 (1967)
93. JINDRA, A.
Trennung des Pyridoxins von Ascorbinsäure
Z. analyt. Chem. 171, 238 (1959/60)
94. JOHNSON, R.J., METZLER, D.E.
Analyzing spectra of vitamin B₆-derivatives
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B.McCormick und L.D.Wright
Academic Press, New York-London (1970)

95. JONES, A., MORRIS, S.
Analyst 75, 613 (1950)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
96. KHEIM, T., KIRK, J.E.
Vitamin B₆ content of human arterial and venous tissue
Am. J. Clin. Nutr. 20, 702 (1967)
97. KLOTZ, L., HÜTTENRAUCH, R.
Die Trennung wasserlöslicher Vitamine an Ionenaustauscherpapieren
Arch. Pharm. (Weinheim) 296, 720 (1963)
98. KLOTZ, L., POETHKE, W.
Die Trennung und Bestimmung der Vitamin B-Komplexe
mittels synthetischer Ionenaustauscherharze
Pharmazeutische Zentralhalle für Deutschland 103, 1 (1964)
99. KNOBLOCH, E.
Physikalisch-chemische Vitaminbestimmungsmethoden
Akademie-Verlag, Berlin (1963)
100. KNOBLOCH, E., VOGEL, H.
Chemie und Technik der Vitamine
Enke Verlag, Stuttgart (1957)
101. KÖRNER, W.F., NOWAK, H.
Die Anwendung des Tryptophan-Belastungstests zur
quantitativen Prüfung von Verbindungen auf Vitamin B₆-
Wirksamkeit
Int. Z. Vitaminforsch. 36, 264 (1966 a)
102. KÖRNER, W., NOWAK, H.
Quantitative Bestimmung der biologischen Antivitamin
B₆-Wirkung von Pyridoxol-Antagonisten
Int. Z. Vitaminforsch. 37, 89 (1966 b)

103. KORTÚM, G.
Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie
Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis Bd 2
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
104. KORYTNYK, W.
Gaschromatography of vitamin B₆
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B.McCormick und L.D.Wright
Academic Press, New York-London (1970)
105. KORYTNYK, W., AHRENS, H.
Nuclear magnetic resonance spectroscopy of vitamin B₆
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B.McCormick und L.D.Wright
Academic Press, New York-London (1970)
106. KORYTNYK, W., FRICKE, G., PAUL, B.
Pyridoxine chemistry - Gaschromatography of compounds
in the vitamin B₆ group
Anal. Biochem. 17, 66 (1966)
107. KORYTNYK, W., SINGH, R.P.
Proton magnetic resonance spectra of compounds in
the vitamin B₆ group
J. Am. Chem. Soc. 85, 2813 (1963)
108. KOZELUHOVA, K.
Stimulation of the growth reaction of the yeast
kloeckera brevis to the presence of vitamin B₆
Folia Microbiol. (Praha) 14, 506 (1969)
109. KREBS, E.G., FISCHER, E.H.
Advan. Enzymol. 24, 263 (1962)
Zit.: SHALTIEL, HEDRICK und FISCHER (1966)

110. KÜHNAU, J., STEPP, W., SCHROEDER, H.
Die Vitamine und ihre klinische Anwendung Bd 1, Bd 2
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1952/54)
111. KUHN, R., LÖW, I.
Über eine spezifische Farbreaktion des Adermins
Berichte der Deutschen-Chemischen Gesellschaft
72, 1453 (1939)
112. LABOUESSE, J., CHATAGNER, F., JOLLES-BERGERET, B.
Dosage du phosphate de pyridoxal dans le foie du rat
normal, du rat thyrotoxique et du rat thyroïdectomisé
Biochim. Biophys. Acta. 39, 372 (1960)
113. LaDUE, J.S., WROBLEWSKI, F., KARMEN, A.
Serum glutamic oxalacetic transaminase activity in
human acute transmural myocardial infarction
Science 120, 497 (1954)
114. LEURQUIN, J.L., HERMANN, J.C.
J. Pharm. Belgique 17, 111 (1962)
Zit.: GSTIRNER (1965)
115. LEWIN, L.M., BROWN, G.M.
The biosynthesis of thiamine. IV. Inhibition by
vitamin B₆ compounds
Arch. Biochem. Biophys. 101, 197 (1963)
116. LEVINE, V.E., HANSEN, W.G.
A new color reaction for pyridoxal based upon its
interaction with thiophene
Biochim. Biophys. Acta. 31, 248 (1959)
117. LINGANE, J.J., DAVIS, O.L.
Polarographic determination of riboflavin and other
vitamin B factors
J. Biol. Chem. 137, 567 (1941)

118. MAEDA, Y.
The effect of pyridoxal phosphate on SGO-T activity
in myocardial infarction
Jap. Circ. J. 29, 365 (1965)
119. Mac ARTHUR, M. J., LEHMANN, J.
Chromatographic separation and fluorometric measurement
of vitamin B₆ components in aqueous solutions
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists. 42, 619 (1959)
120. Mac ARTHUR POLANSKY, M., MURPHY, E., TOEPFER, E. W.
Components of vitamin B₆ in grains and cereal products
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists. 47, 750 (1964)
121. MAIWALD, L., MASKE, H.
Der papierchromatographische Nachweis von Pyridoxin,
Pyridoxamin, Nicotinsäure und Nicotinsäureamid
Z. Physiol. Chem. 306, 143 (1956)
122. MANOUSEK, O.
Polarographische Studie der Reaktion des Pyridoxals
mit Pyridoxamin
Naturwissenschaften 2, 323 (1959)
123. MANOUSEK, O., KOCOVA, P.
Polarographische Bestimmung des Pyridoxols in pharmazeu-
tischen Präparaten
Mikrochim. Acta. 5, 754 (1961)
124. MANOUSEK, O., ZUMAN, P.
Polarographische Bestimmung des Pyridoxals und
Pyridoxal-5-Phosphats
Journal of Electroanalytical Chemistry 4, 324 (1960)

125. MARUYAMA,H., COURSIN,D.B.
Enzymic assay of pyridoxal phosphate using tyrosine
apodecarboxylase and tyrosine-1-¹⁴C
Anal. Biochem. 26, 420 (1968)
126. MAYOR,F., CASCALES,M., MARCOS,P., SANTOS RUIZ,A.
Determinación de la constante de Michaelis-Menten.
Su aplicación a la valoración de piridoxal-5-fosfato
Rev. Esp. Fisiol. 18, 77 (1962)
127. McCORMICK,D.B., GREGORY,M.E., SNELL,E.E.
Pyridoxal-phosphokinase - assay, distribution, puri-
fication and properties
J. Biol. Chem. 236, 2076 (1961)
128. McKUSICK,A.B., SHERWIN,R.W., GRUPENHOFF JONES,L.,
HSU,J.M.
Urinary excretion of pyridoxine and 4-pyridoxic acid
in rheumatoid arthritis
Arthritis Rheum. 7, 636 (1964)
129. MELNICK,D., HOCHBERG,M., HIMES,H.W., OSER,B.L.
The multiple nature of vitamin B₆ critique of methods
for the determination of the complex and its components
J. Biol. Chem. 160, 1 (1945)
130. METZLER,D.E., OLIVARD,J., SNELL,E.E.
Transamination of pyridoxamine and amino acids with
glyoxylic acid
J. Am. Chem. Soc. 76, 644 (1954)
131. METZLER,D.E., SNELL,E.E.
Some transamination reactions involving vitamin B₆
J. A. Chem. Soc. 74, 979 (1952)

132. MORRIS, J.G., HUGHES, D.T.D., MULDER, C.
Observations on the assay of vitamin B₆ with
saccharomyces carlsbergiensis 4228
J. Gen. Microbiol. 20, 566 (1959)
133. MÜCKE, D.
Einführung in mikrobiologische Bestimmungsverfahren
VEB Georg Thieme-Verlag Leipzig (1957)
134. NEJSEL, M.M., POMOSNIKOVA, N.A.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR 91, 953 (1953)
Zit.: FRAGNER (1964)
135. NÜRNBERG, E.
Zur Dünnschichtchromatographie auf dem Vitamingebiet
Deut. Apotheker Ztg. 101, 268 (1961)
136. OHISHI, N., FUKUI, S.
Further study on the reaction products of pyridoxal
and pyridoxal-5-phosphate with cyanide
Arch. Biochem. Biophys. 128, 606 (1968)
137. OKUDA, K.S., FUJI, S., WADA, M.
Microassay of pyridoxal phosphate using tryptophan
¹⁴C with tryptophanase
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B. McCormick, L.D. Wright
Academic Press, New York-London (1970)
138. OTT, W.H.
Antipyridoxine-activity of 2,4-dimethyl-3-hydroxy-
5-hydroxymethylpyridine in the chick
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42, 125 (1946)

139. PARDINI, R.S., ARGOUDELIS, C.J.
Biosynthesis of vitamin B₆ by a yeast mutant
J. Bacteriol 93, 672 (1968)
140. PARRISH, W.P., LOY, H.W., KLINE, O.L.
A study of the yeast method for vitamin B₆
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists. 38, 506 (1955)
141. PETERSON, E.A., SOBER, H.A.
Preparation of crystalline phosphorylated derivatives
of vitamin B₆
J. Am. Chem. Soc. 76, 169 (1954)
142. POLANSKY, M.M.
Vitamin B₆ components in fresh and dried vegetables
J. Am. Diet. Assoc. 54, 118 (1969)
143. POLANSKY, M.M., CAMARRA, R., TOEPFER, E.W.
in Druck (1964)
Zit.: TOEPFER und Mac ARTHUR POLANSKY (1964)
144. PROSSER, A.R., SHEPPARD, A.J., LIBBY, D.A.
Gasliquid chromatography of vitamin B₆ (pyridoxal,
pyridoxol and pyridoxamine) and its application to
pharmaceuticals containing pyridoxol
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists. 50, 1348 (1967)
145. PUSZTAI, A.
Magy. Kem. Falyoirat 60, 323 (1954)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
146. RABINOWITZ, J.C., MONDY, N.I., SNELL, E.E.
The vitamin B₆ group - an improved procedure for
determination of pyridoxal with lactobacillus casei
J. Biol. Chem. 175, 147 (1948)

147. RABINOWITZ, J.C., SNELL, E.E.
The vitamin B₆ group - an improved method for assay
of vitamin B₆ with streptococcus faecalis
J. Biol. Chem. 169, 631 (1947 a)
148. RABINOWITZ, J.C., SNELL, E.E.
The vitamin B₆ group - microbiological activity and
natural occurrence of pyridoxamine phosphate
J. Biol. Chem. 169, 643 (1947 b)
149. RABINOWITZ, J.C., SNELL, E.E.
The vitamin B₆-group - distribution of pyridoxal,
pyridoxamine and pyridoxine in some natural products
J. Biol. Chem. 176, 1157 (1948)
150. RAICA, N., SAUBERLICH, H.E.
Blood cell transaminase activity in human vitamin B₆
deficiency
Am. J. Clin. Nutr. 15, 67 (1964)
151. RAINES, R.C., HASKELL, B.E.
Peptide stimulation of streptococcus faecium, a test
organism for pyridoxal and pyridoxamine
Anal. Biochem. 23, 413 (1968)
152. REDDY, S.K., REYNOLDS, M.S., PRICE, J.M.
The determination of 4-pyridoxic acid in human urine
J. Biol. Chem. 233, 691 (1958)
153. RENNAGEL, W.R., KORYTNYK, W.
Difficulties in vitamin B₆ nomenclature
Experientia (Berlin) 24, 304 (1968)
154. RICHTER, H.E.
Beitrag zur kolorimetrischen Bestimmung von Vitamin B₆
in biologischem Material
Mikrochim. Acta. 3, 455 (1962)

155. RITCHEY, S.J., FEELEY, R.M.
The excretion patterns of vitamin B₆ and B₁₂ in
preadolescent girls
J. Nutr. 89, 411 (1966)
156. RODWELL, V.W., VOLCANI, B.E., IKAWA, M., SNELL, E.E.
Bacterial oxidation of vitamin B₆ - isopyridoxal
and 5-pyridoxic acid
J. Biol. Chem. 233, 1548 (1958)
157. ROTH, H.J., SURBORG, K.H.
Die Rolle der Borsäure bei der Gehaltsbestimmung von
Pyridoxol mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid
Arch. Pharm. (Weinheim) 301, 646 (1968)
158. RUBIN, S.H., SCHEINER, J., HIRSCHBERG, E.
The availability of vitamin B₆ in yeast and liver
for growth of *saccharomyces carlsbergensis*
159. SAKURAGI, T., KUMMEROW, F.A.
Pyridoxine N-oxide
J. Org. Chem. 24, 1032 (1959)
160. SARETT, H.P.
A study of the measurement of 4-pyridoxic acid in
urine
J. Biol. Chem. 189, 769 (1951)
161. SARMA, P.S., SNELL, E.E., ELVEHJEM, C.A.
The vitamin B₆ group - biological assay of pyridoxal,
pyridoxamine and pyridoxine
J. Biol. Chem. 165, 55 (1946)

162. SCEMAMA, M.
Colorimetrische Bestimmung von Pyridoxin (im Harn
mit 2,6-Dichlorchinonchlorimid)
Z. Analyt. Chem. 160, 233 (1958)
163. SCHNEIDER, H.A., ASCHAM, J.K., PLATZ, P.R., STEENBOCK, H.
J. Nutr. 18, 99 (1939)
Zit.: BLISS und GYÖRGY (1951)
164. SCHREIBER, G.
Pyridoxal-5-phosphat und Pyridoxamin-5-phosphat
in: Methoden der Enzymatischen Analyse, Bd 2, 2. Auflage
Hrsg.: Hans Ullrich Bergmeyer
Verlag der Chemie Weinheim/Bergstraße (1970)
165. SCHREIBER, G., ECKSTEIN, M., MAASS, G., HOLZER, H.
Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Apo-
aspartataminotransferase aus Bierhefe
Biochem. Z. 340, 21 (1964)
166. SCHREIBER, G., ECKSTEIN, M., OESER, A., HOLZER, H.
Anreicherung einer Aspartataminotransferase aus
Bierhefe
Biochem. Z. 340, 13 (1964 a)
167. SCHREIBER, G., ECKSTEIN, M., OESER, A., HOLZER, H.
Zur Bestimmung von Pyridoxal-5-phosphorsäureester
und Pyridoxamin-5-phosphorsäureester mit Apoaspartat-
aminotransferase aus Bierhefe
Biochem. Z. 340, 35 (1964 b)
168. SCHWARZ, I., KOCH, A.
Der Tribolium-Test als quantitativer Test für acht
B-Vitamine
Z. Vitamin Harmon. Fermentforsch. 12, 291 (1963)

169. SCUDI, J.V.
On the colorimetric determination of vitamin B₆
J. Biol. Chem. 139, 707 (1944)
170. SEBRELL, W.H., HARRIS, R.S.
Vitamins, Vol. I, II, III
Academic Press, New York (1954)
171. SENNELLO, L.T., ARGOUDELIS, C.J.
A gas chromatographic procedure for the simultaneous
determination of pyridoxine, ascorbic acid, and
nicotinamide in vitamin capsules and tablets
Anal. Chem. 41, 171 (1969)
172. SHAH, R.C., RAMAN, P.V., MEHTA, M.M.
Spectrophotometric determination of pyridoxine hydro-
chloride in multivitamin preparations
J. Pharm. Sci. 54, 432 (1965)
173. SHAH, R.C., RAMAN, P.V., SHAH, B.M.
J. Pharm. Sci. 52, 167 (1963)
Zit.: SHAH, RAMAN und MEHTA (1965)
174. SHALTIEL, S., HEDRICK, J.L., FISCHER, E.H.
On the role of pyridoxal 5-phosphate in phosphorylase -
resolution of rabbit muscle phosphorylase b
Biochemistry 5, 2108 (1966)
175. SHEPPARD, A.A., PROSSER, A.R.
Gas chromatography of vitamin B₆
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B. McCormick und L.D. Wright
Academic Press, New York-London (1970)

176. SIEGEL, F.P., BLAKE, M.I.
Spectrophotometric determination of pyridoxal in the
presence of pyridoxamine and pyridoxine
Anal. Chem. 34, 397 (1962)
177. SIEGEL, L., MELNICK, D., OSER, B.L.
Bound pyridoxine in biological materials
J. Biol. Chem. 149, 361 (1943)
178. SILIPRANDI, N., SILIPRANDI, D., LIS, H.
Separation and determination of vitamin B₆ group -
separation by paper electrophoresis of riboflavin groups
Biochim. Biophys. Acta. 14, 213 (1954)
179. SNELL, E.E.
The vitamin B₆ group - the reversible interconversion of
pyridoxal and pyridoxamine by transamination reactions
J. Am. Chem. Soc. 67, 194 (1945)
180. SNELL, E.E.
Microbiological methods in vitamin research
in: Vitamin Methods, Bd 1
Hrsg.: P. György
Academic Press Inc., New York (1951)
181. SNELL, E.E.
Vitamin B₆
in: Comprehensive Biochemistry, Vol. XI
Hrsg.: Florkin und Stotz
Elsevier Publishing Comp. Amsterdam-London-New York (1963)
182. SNELL, E.E., RANNEFELD, A.N!
The vitamin B₆ group - the vitamin activity of
pyridoxal and pyridoxamine for various organisms
J. Biol. Chem. 157, 475 (1945)

183. SNYDER, J.Q., WENDER, H.S.
Arch. Biochem. Biophys. 46, 465 (1953)
Zit.: LEVINE und HANSEN (1958)
184. SODA, K., YORIFUJI, T., MITSONO, H., MORIGUCHI, M.
Spectrophotometric determination of pyridoxal and
pyridoxal-5-phosphate with 3-methyl-2-benzothiazolone
hydrazone hydrochloride and their selective assay
Biochem. J. 114, 629 (1969)
185. STANULOVIC, M., MILETIC, D., STOCK, A.
Die Diagnostik des Vitamin B₆-Mangels auf Grund der
Bestimmung von Erythrocytärer L-Aspartat 2-Oyoglutarat
Aminotransferase und ihrer Stimulation in vitro mit
pyridoxal-5-phosphat
Clin. Chim. Acta. 17, 353 (1967)
186. STILLER, E.T.
Physical methods of vitamin assay
in: Vitamin Methods, Vol. I
Hrsg.: György
Academic Press, New York (1951)
187. STILLER, E.T., KERESZTESY, J.C., STEVENS, J.R.
The structure of vitamin B₆
J. Am. Chem. Soc. 61, 1237 (1939)
188. STOKES, J.L., LARSEN, A., WOODWARD, C.R., FORSTER, J.W.
A neurospora assay for pyridoxine
J. Biol. Chem. 150, 17 (1943)
189. STORVICK, C.A., BENSON, E.M., EDWARDS, M.A., WOODRING, M.J.
Chemical and microbiological determination of vitamin B₆
in: Methods of Biochemical Analysis, Vol. XII
Hrsg.: D. Glick
Interscience Publishers, New York-London-Sydney (1964)

190. STORVICK, C.A., EDWARDS, M.A., BENSON, E.M., WOODRING, M.J.
in Druck (1963)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
191. STORVICK, C.A., McLEOD PETERS, J.
Methods for the determination of vitamin B₆ in
biological materials
in: Vitamins und Hormones
Hrsg.: R.S. Harris, K.V. Thimann
Academic Press, New York-London (1964)
192. STROHECKER, R., HENNING, H.M.
Vitaminbestimmungen
Hrsg.: Merck AG, Darmstadt
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße (1963)
193. SUNDARESAN, P.R., COURSIN, D.B.
Microassay of pyridoxal phosphate using l-tyrosine-
1-¹⁴C and tyrosine apodecarboxylase
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B. McCormick und L.D. Wright
Academic Press, New York-London (1970)
194. SWEENEY, J.P., HALL, W.L.
A new chemical approach to the determination of vitamin B₆
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists. 35, 479 (1952)
195. SZABOLCS, L.
Zur spezifischen Bestimmung von Vitamin B₆ in Arznei-
mittelzubereitungen
Z. Analyt. Chem. 146, 290 (1955)
196. TAKANASHI, S., MATSUNAGA, I., TAMURA, Z.
Fluorometric determination of pyridoxal and its
5-phosphate in biological materials
J. Vitaminol (Kyoto) 16, 132 (1970)

197. TAKANASHI,S., TAMURA,Z.
Preliminary studies for fluorometric determination
of pyridoxal and of its 5-phosphate
J. Vitaminol. (Kyoto) 16, 129 (1970)
198. TAKANASHI,S., TAMURA,Z., YOSHINO,A., JIDAKA,Y.
Reaction of pyridoxal with cyanide
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 16, 758 (1968)
199. TAMURA,Z., TAKANASHI,S.
Fluorometric determination of pyridoxal and pyridoxal-
5-phosphate in biological materials by the reaction
with cyanide
in: Methods in Enzymology, Vol. XVIII
Hrsg.: D.B.McCormick und L.D.Wright
Academic Press, New York-London (1970)
200. TATUM,E.L., RITCHEY,M.G., COWDRY,E.V., WICKS,L.F.
Vitamin content of mouse epidermis during methyl-
cholanthrene carcinogenesis
J. Biol. Chem. 163, 675 (1946)
201. THIELE,V.F., BRIN,M.
Availability of vitamin B₆ vitamers fed orally to long-
evans rats as determined by tissue transaminase activity
and vitamin B₆ assay
J. Nutr. 94, 237 (1968)
202. TOEPFER,E.W., LEHMANN,J.
Procedure for chromatographic separation and microbiolo-
gical assay of pyridoxine, pyridoxal and pyridoxamine in
food extracts.
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists. 44, 426 (1961)

203. TOEPFER,E.W., MacARTHUR,M.J., LEHMANN,J.
Chromatographic separation of vitamin B₆ components in
food extracts
J. Assoc. Offic. Anal. Chemists. 43, 57 (1960)
204. TOEPFER,E.W., MacARTHUR POLANSKY,M.J.
Recent developments in the analysis for vitamin B₆
in foods
in: Vitamins and Hormones
Hrsg.: R.S.Harris, K.V.Thimann
Academic Press Inc., New York-London (1964)
205. TOEPFER,E.W., MacARTHUR POLANSKY,M., HEWSTON,M.
Fluorometric determination of pyridoxamine by
conversion to pyridoxal cyanide compound
Anal. Biochem. 2, 463 (1961)
206. TSUJI,K.
Liquid nitrogen preservation of saccharomyces
carlsbergiensis and its use in a rapid biological
assay of vitamin B₆
Appl. Microbiol. 14, 456 (1966)
207. UMBREIT,W.W., BELLAMY,W.D., GUNSALUS,I.C.
The function of pyridoxin dervatives: a comparison of
natural and synthetic codecarboxylase
Arch. Biochem. 7, 185 (1945)
208. URBANYI,T., BUDVARI,S.
Further applications of diazotized 4-amino-6-chloro-
m-benzenedisulfonamide
J. Pharm. Sci 57, 138 (1968)

209. WACHSTEIN, M., KELLNER, J.D., ORTIZ, J.M.
Pyridoxal phosphate in plasma and leukocytes of normal and pregnant subjects following B₆ load tests
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 350 (1960)
210. WADA, H., MORISUE, T., SAKAMOTO, Y., ICHIHARA, K.
Quantitative determination of pyridoxal-phosphate by apotryptophanase of escherichia coli
J. Vitaminol (Kyoto) 3, 183 (1957)
211. WADA, H., SNELL, E.E.
The enzymatic oxidation of pyridoxine and pyridoxamine phosphates
J. Biol. Chem. 236, 2089 (1961)
212. WADA, H., SNELL, E.E.
Enzymatic transamination of pyridoxamine - with oxaloacetate and α -ketoglutarate
J. Biol. Chem. 237, 127 (1962 a)
213. WADA, H., SNELL, E.E.
Enzymatic transamination of pyridoxamine - crystalline pyridoxamine-pyruvate transaminase
J. Biol. Chem. 237, 133 (1962 b)
214. WADE, H.E., MORGAN, D.M.
Nature 171, 529 (1953)
Zit.: STORVICK, BENSON, EDWARDS und WOODRING (1964)
215. WALSH, M.P.
Determination of plasma pyridoxal phosphate with wheat germ glutamicaspartic apotransaminase
Am. J. Clin. Nutr. 46, 282 (1966)
216. WAMPLER, J.E., CHURCHICH, J.E.
Phosphorescence of pyridoxal
J. Biol. Chem. 244, 1477 (1969)

217. WEBER, O.W., URBIGKEIT, J.R., SENKOWSKI, B.Z.
Automated procedure for the determination of pyridoxine
in multivitamin tablets
Ann. NY Acad. Sci. 153, 461 (1968)
218. WOOD, W.A., GUNSALUS, I.C., UMBREIT, W.W.
Function of pyridoxal phosphate: resolution and
purification of the tryptophanase enzyme of *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. 170, 313 (1947)
219. WOODRING, M.J., FISHER, D.H., STORVICK, C.A.
A microprocedure for the determination of 4-pyridoxic
acid in urine
Clin. Chem. 10, 479 (1969)
220. YAMADA, M., SAITO, A.
Fundamental studies on the separation of pyridoxal-5-
phosphate by thin-layer chromatograph and by cellulose
ion exchanger column
J. Vitaminol (Kyoto) 11, 192 (1965)
221. YAMADA, M., SAITO, A., TAMURA, Z.
Fluorometric determination of pyridoxal-5-phosphate and
pyridoxal in biological materials - procedure and
application
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 14, 482 (1966 a)
222. YAMADA, M., SAITO, A., TAMURA, Z.
Fluorometric determination of pyridoxal-5-phosphate and
pyridoxal in biological materials. - Specificity of the
method in pyridoxal-5-phosphate determination
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 14, 488 (1966 b)
223. ZIEGLER, E., REINKEN, L., BERGER, H.
Die Ausscheidung von Pyridoxinsäure beim Neugeborenen
und ihre Beeinflussung durch Pyridoxinbelastung
Int. Z. Vitaminforsch. 39, 192 (1969)

Herrn Professor Dr. Dr. E. Weinig danke ich für die freundliche Unterstützung durch Überlassung eines Arbeitsplatzes, für Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit und die Übernahme des Korreferates.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner geduldigen Doktor-Mutter, Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt, für das Thema der Arbeit und ihrer Hilfsbereitschaft bei deren Ausführung.

Lebenslauf

Am 19. April 1945, wurde ich als Sohn der Eheleute Friedrich und Rosemarie Thömmes, geb. Roßberg, in Mittweida/Sachsen geboren.

Nach Volksschule und 7 Klassen Realgymnasium in Erlangen, besuchte ich im Schuljahr 1962/63 im Rahmen eines internationalen Schüleraustausches die North-Penn-Highschool in Lansdale, Pa., USA.

1966 bestand ich die Reifeprüfung am Willstätter Gymnasium in Nürnberg und leistete anschließend einen verkürzten Wehrdienst ab.

1967 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander Universität in Erlangen für Zahnmedizin. Im Juli 1968 legte ich den naturwissenschaftlichen, im April 1970 den medizinischen Teil der zahnärztlichen Vorprüfung ab. Im Oktober 1972 bestand ich die zahnärztliche Prüfung.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990